

Subtypeselektivität allosterischer Liganden an muskarinischen  
Acetylcholinrezeptoren – Untersuchungen mit  
strukturmodifizierten Alkan-Bisammonium-Verbindungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Matthias Sennwitz

aus

Amberg

Bonn 2006







Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr
2. Referent: Prof. Dr. med Kurt Racké

Tag der mündlichen Prüfung: 25.08.06

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2003 bis März 2006 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.





<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Prinzip der allosterischen Modulation .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Therapeutische Aspekte der allosterischen Modulation .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Allosterische Modulatoren an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b>Herstellung von Membransuspensionen .....</b>	<b>11</b>
2.1.1	Membransuspension aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins .....	11
2.1.2	Membransuspension aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) .....	12
<b>2.2</b>	<b>Proteingehaltsbestimmung der Membransuspensionen .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Radioligandbindungsstudien.....</b>	<b>14</b>
2.3.1	Allgemeine theoretische Grundlagen .....	14
2.3.2	Homologe Konkurrenzexperimente .....	15
2.3.3	Heterologe Interaktionsexperimente .....	22
2.3.4	Heterologe Konkurrenzexperimente mit Acetylcholin und [ <sup>3</sup> H]NMS in An- und Abwesenheit eines Allostere .....	26
2.3.5	Kinetische Experimente .....	29
<b>2.4</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>37</b>
2.4.1	Orthostereische Liganden .....	37
2.4.2	Allosterische Modulatoren .....	39
2.4.3	Lösungen .....	42
2.4.4	Reagenzien .....	43
2.4.5	Verbrauchsmaterialien .....	45
2.4.6	Geräte .....	46

---

2.4.7	Computerprogramme .....	48
<b>2.5</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der verwendeten Membransuspensionen .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Vergleich: Komplette [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationsversuche und 2-Punkt-Dissoziationsversuche .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3</b>	<b>Modulation der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung an muskarinische M<sub>2</sub>-Rezeptoren durch W84 und Derivate .....</b>	<b>59</b>
3.3.1	Einfluss einer ein- bzw. beidseitigen Monomethylierung der Seitenkette verglichen mit einer Dimethylierung .....	60
3.3.2	Einfluss der Größe der Substituenten an der Seitenkette.....	65
3.3.3	Einfluss einer Aminierung bzw. Nitrierung des lateralen Naphthalimidrings.....	69
3.3.4	Einfluss eines Stickstoff-Silizium-Austauschs bei W84-Derivaten .....	73
3.3.5	Weitere strukturveränderte und verkürzte W84-Derivate .....	77
<b>3.4</b>	<b>Modulation der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen durch Alkan-Bisammonium-Verbindungen .....</b>	<b>80</b>
3.4.1	Einfluss der Inkubationszeit auf den Effekt von allosterischen Modulatoren auf die [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindung unter Verwendung von CHO-Membranen .....	80
3.4.2	Charakterisierung der Affinität von AF-DX 384 zu den muskarinischen Rezeptorsubtypen unter Gleichgewichtsbedingungen .....	84
3.4.3	Charakterisierung der Affinität von W84 zu den muskarinischen Rezeptorsubtypen .....	86
3.4.4	Charakterisierung der Affinität von Naphmethonium zu den muskarinischen Rezeptorsubtypen .....	89
3.4.5	Einfluss der Variation des lateralen Ringsystems auf das Muster der Subtypselektivität von W84-Derivaten ohne Seitenkettenmethylierung.....	90
3.4.6	Einfluss der Variation des lateralen Ringsystems auf das Muster der Subtypselektivität von W84-Derivaten mit Seitenkettenmethylierung.....	96

3.4.7	Charakterisierung der Affinität eines tertiären Alkan-Bisammonium-Derivats zu den muskarinischen Rezeptorsubtypen .....	101
3.5	<b>Modulation der Bindung von Acetylcholin an die muskarinischen Rezeptorsubtypen.....</b>	<b>106</b>
4	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>115</b>
4.1	<b>Struktur-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten allosterischen Alkan-Bisammonium-Verbindungen an M<sub>2</sub>-Rezeptoren .....</b>	<b>115</b>
4.1.1	Methylierungsgrad .....	116
4.1.2	Größe der Substituenten der Seitenkette.....	117
4.1.3	Aminierung und Nitrierung .....	119
4.1.4	Silizium-haltige und tertiäre Verbindungen .....	120
4.1.5	Weitere Strukturveränderungen .....	121
4.2	<b>Auswertung der Gleichgewichtsbindungsexperimente unter Berücksichtigung der dissoziationsverzögernden Wirkung der Allosterie.....</b>	<b>122</b>
4.3	<b>Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Hinblick auf die Subtypselektivität .....</b>	<b>126</b>
4.4	<b>Interaktion von Naphmethonium mit Acetylcholin an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen .....</b>	<b>133</b>
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>135</b>
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>139</b>
7	<b>ANHANG .....</b>	<b>145</b>
8	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>149</b>
8.1	<b>Wissenschaftliche Originalarbeiten .....</b>	<b>149</b>
8.2	<b>Abstrakta und Kongressbeiträge .....</b>	<b>149</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 *Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren*

Das vegetative Nervensystem wird hinsichtlich morphologischer und funktioneller Gesichtspunkte in zwei Teilsysteme untergliedert, den Sympathikus und den Parasympathikus. Der Überträgerstoff Acetylcholin spielt hier eine wichtige Rolle. Er vermittelt die Erregungsübertragung von präganglionären auf postganglionäre Neurone sowohl im sympathischen als auch im parasympathischen Nervensystem. Im Parasympathikus ist Acetylcholin des weitern für die Erregungsübertragung auf die Erfolgsorgane verantwortlich, während im Sympathikus diese Aufgabe von Noradrenalin übernommen wird. Die Rezeptoren, an denen Acetylcholin angreift, werden in nicotinische und muskarinische unterschieden. Bei den nicotinischen Acetylcholin-Rezeptoren handelt es sich um ligandgesteuerte Ionenkanäle, die im ZNS, in den vegetativen Ganglien und an den neuromuskulären Endplatten lokalisiert sind. Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und sind in Ganglien und parasympathischen Synapsen lokalisiert. Das Rezeptorprotein besteht aus sieben hydrophoben, transmembranären  $\alpha$ -Helices (TM1-TM7), die ringförmig angeordnet sind und die Bindungstasche für den endogenen Agonisten Acetylcholin bilden, sowie drei intrazellulären und drei extrazellulären Schleifen [1]. Der Aminoterminus befindet sich im Extrazellularraum, das carboxy-terminale Ende im Cytoplasma. Als Grundlage zur dreidimensionalen Darstellung der Muskarinrezeptoren und als Modell für alle GPCRs steht seit kurzer Zeit die mittels hochauflösender Röntgenstrukturanalyse ermittelte Kristallstruktur des Rinderrhodopsins zur Verfügung [2].

Von den muskarinischen Rezeptoren sind bislang fünf Subtypen ( $M_1$ - $M_5$ ) bekannt [3, 4, 5], die sich u.a. hinsichtlich der Gewebeverteilung, der G-Protein-Kopplung und somit der nachgeschalteten Effektorproteine unterscheiden. Die  $M_1$ -,  $M_3$ - und  $M_5$ -

Rezeptoren koppeln an die  $\alpha$ -Untereinheit von stimulierenden  $G_{q/11}$ -Proteinen und aktivieren daraufhin die Phospholipase C, was über eine Freisetzung von Inositoltriphosphat zur Mobilisierung von intrazellulären Ca-Ionen führt. Dagegen koppeln  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren vorwiegend an die  $\alpha$ -Untereinheiten der inhibitorischen  $G_i$ - und  $G_o$ -Proteine und hemmen so die Adenylatcyclase, was zu einem Absinken des cAMP-Spiegels führt bzw. fördern die Öffnung von  $K^+$ -Kanälen [6, 7].

Zur Aufklärung der Gewebeverteilung der unterschiedlichen Subtypen wurden verschiedene Methoden verwandt. Neben der Quantifizierung von mRNA [8] wurden z.B. Immunoassays mit selektiven Antikörpern [9, 10, 11] durchgeführt. Zum jetzigen Zeitpunkt weiß man, dass  $M_1$ -Rezeptoren vor allem in Nervenzellen vorkommen.  $M_2$ -Rezeptoren sind vor allem am Herzen, im Gehirn und in der glatten Muskulatur lokalisiert. Exokrine Drüsen und die glatte Muskulatur z.B. des Darms und der Bronchien weisen eine hohe Dichte an  $M_3$ -Rezeptoren auf.  $M_4$ - und  $M_5$ -Rezeptoren werden vorwiegend im ZNS exprimiert, wobei der Subtyp  $M_4$  vornehmlich in Bereichen des Vorderhirns und des Striatums zu finden ist und der  $M_5$ -Subtyp hauptsächlich in Bereichen der Substantia nigra und des Hippocampus vorkommt [6, 12]. Es fällt jedoch schwer, eine bestimmte physiologische Funktion einem Rezeptorsubtyp zuzuordnen, da in verschiedenen Geweben jeweils mehrere Subtypen muskarinischer Rezeptoren auftreten. Allgemein kann jedoch gesagt werden, dass muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren in der Peripherie z.B. die Funktion des Herzens, die Kontraktion glatter Muskulatur und die Sekretion exokriner Drüsen beeinflussen. Zentral sind sie unter anderem an der Regulation der Körpertemperatur, der Schmerzwahrnehmung und der Gedächtnisfunktion beteiligt [6, 13, 14]. Weitere Versuche mit Knock-out-Mäusen werden jedoch noch bessere Einsicht in die physiologische Bedeutung der einzelnen muskarinischen Subtypen geben [15, 16, 17].

## **1.2 Prinzip der allosterischen Modulation**

Das Prinzip der allosterischen Modulation ist für die muskarinischen Rezeptoren gut beschrieben [18]. Man weiß, dass alle fünf Subtypen der Muskarinrezeptoren,  $M_1$ - $M_5$ ,

allosterisch modulierbar sind [19]. Die orthosterische Bindungsstelle, an die sich der endogene Ligand Acetylcholin sowie Agonisten und Antagonisten anlagern, liegt tief im Rezeptorprotein im Bereich der transmembranären Domänen und weist im Vergleich der Subtypen eine hohe Sequenzhomologie auf [1, 20]. Allosterie greifen an einer anderen Bindungsstelle am Rezeptor an, der sog. allosterischen Bindungsstelle, die weiter ausserhalb am Rezeptor gelegen ist. Sie liegt im Bereich der extrazellulären Schleifen und ist innerhalb der Subtypen weniger stark konserviert [21, 22, 23]. Da diese Bindungsstelle von mehreren strukturell unterschiedlichen allosterischen Modulatoren wie beispielsweise Gallamin, W84 und Alcuronium verwendet wird, wird sie auch als „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ („common allosteric site“) bezeichnet [24, 25]. In den letzten Jahren hat es jedoch auch vermehrt Hinweise auf eine noch nicht genau lokalisierte, zweite allosterische Bindungsstelle gegeben, über die Substanzen wie Tacrin, Duo3 oder Staurosporin ihre Wirkung entfalten sollen [24, 26, 27].

Allosterische Modulatoren beeinflussen die Affinität des orthosterischen Liganden und werden umgekehrt auch vom orthosterischen Liganden in ihrer Affinität beeinflusst. Da sie nicht die gleiche Bindungsstelle benutzen, interagieren sie also nicht kompetitiv sondern kooperativ miteinander. Der allosterische Ligand kann dabei die Dissoziation des Orthosters verzögern sowie dessen Assoziation hemmen und somit einen Einfluss auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden nehmen [28, 29]. Weist ein allosterischer Modulator eine höhere Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor auf, spricht man von positiver Kooperativität. Die Dissoziation des Orthosters wird dabei stärker gehemmt als dessen Assoziation und die Gleichgewichtsbindung des Orthosters wird somit erhöht. Das Gegenteil ist bei negativer Kooperativität der Fall. Das Alloster hat dann eine höhere Affinität zum unbesetzten Rezeptor und hemmt somit die Assoziation des Orthosters stärker als dessen Dissoziation. Die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden wird somit gesenkt. Ein Spezialfall liegt vor, wenn sich Assoziations- und Dissoziationshemmung die Waage halten. Orthoster und Alloster interagieren somit neutral kooperativ. Die Gleichgewichtsbindung wird nicht beeinflusst. Die Art der allosterischen Interaktion ist generell abhängig vom allosterischen Modulator, dem orthosterischen Liganden und dem Rezeptor-Subtyp [30].

### **1.3 Therapeutische Aspekte der allosterischen Modulation**

Das wohl prominenteste Beispiel, bei dem das allosterische Prinzip im therapeutischen Bereich ausgenutzt wird, sind die Benzodiazepine. Sie greifen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, einem Ligand-gesteuerten Ionen-Kanal, an und erhöhen dadurch die Bindungswahrscheinlichkeit des endogenen Liganden GABA ( $\gamma$ -Amino-Buttersäure). 2004 wurde mit Cinacalcet erstmals ein allosterischer Modulator an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor in Deutschland zur Therapie zugelassen. Cinacalcet bindet an den Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Rezeptor der Nebenschilddrüse und verstärkt so die Wirkung von Ca<sup>2+</sup>.

Allosterische Wirkstoffe bieten Vorteile gegenüber herkömmlichen Agonisten oder Antagonisten. Der Effekt eines allosterischen Modulators ist typischerweise in hohen Konzentrationen selbstlimitierend [31]. Die Gefahr einer Intoxikation mit allosterischen Wirkstoffen ist daher reduziert [32]. Die Wirksamkeit der Allosterie ist an das Vorhandensein bzw. die Ausschüttung des endogenen Liganden gebunden, da Allosterie normalerweise keine eigene Wirkung am Rezeptor zeigen. Unter dem Einfluss von allosterischen Förderern der Orthosterbindung tritt eine Wirkungsverstärkung des endogenen Liganden auf, die dem physiologischen Muster der Stimulation entspricht. Eine Dauerstimulation des Rezeptors, wie in Gegenwart eines agonistischen Pharmakons, findet somit nicht statt.

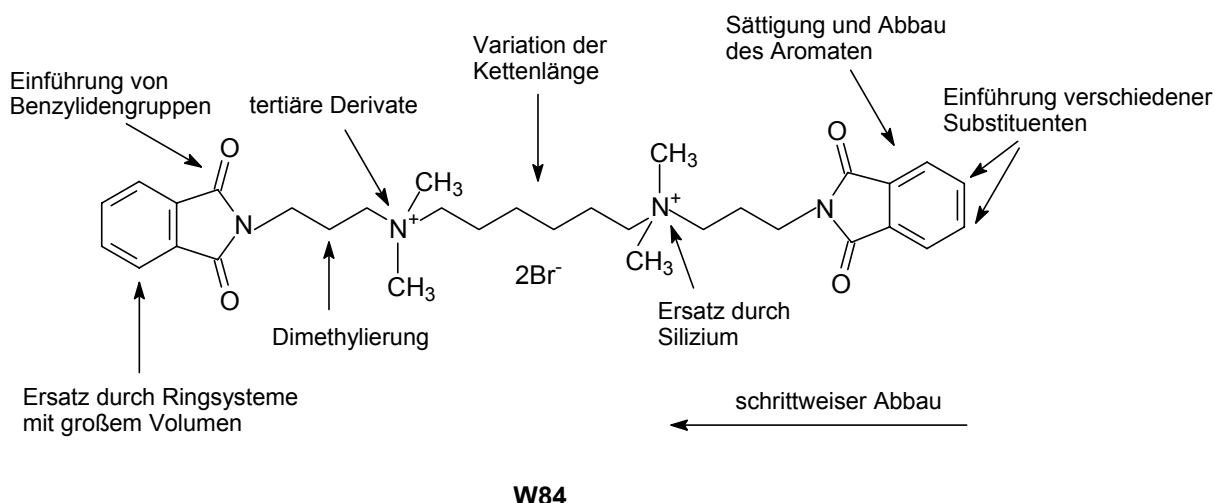
Ein spezieller Vorteil allosterischer Modulatoren am muskarinischen Rezeptor ist die Möglichkeit der Entwicklung subtypselektiver Substanzen. Wie bereits erwähnt, ist die Bindungsstelle für herkömmliche Agonisten und Antagonisten an allen fünf Rezeptorsubtypen stark konserviert. Die Entwicklung eines orthosterischen Liganden, der eine absolute Subtypselektivität aufweist, d.h. nur an einem Rezeptorsubtyp seine Wirkung entfaltet, ist bis jetzt noch nicht gelungen. Alle zur Zeit in Deutschland zugelassenen Arzneistoffe, die an Muskarinrezeptoren angreifen, wie Darifenacin (Emselex<sup>®</sup>) und Solifenacin (Vesikur<sup>®</sup>), weisen in therapeutischer Dosierung eine Präferenz für einen Subtyp auf. In nur wenig höheren Konzentrationen werden jedoch auch andere Subtypen des Muskarinrezeptors beeinflusst. Diese konzentrationsabhängige Subtypselektivität wird auch als „relative Subtypselektivität“ bezeichnet [32]. Auch die meisten bekannten allosterischen Modulatoren weisen eine relative Subtypselektivität auf. Dabei zeigen sie typischerweise die höchste Affinität zum Subtyp M<sub>2</sub> und die geringste Affinität zum



Subtyp  $M_5$  [32, 33, 34]. Da die allosterischen Modulatoren am Muskarinrezeptor jedoch in einer Region binden, die innerhalb der Subtypen größere Unterschiede in der Aminosäuresequenz aufweist, ist auch die Wahrscheinlichkeit, einen stärker subtypselektiven Modulator zu finden, größer. Eine weitere Möglichkeit, absolute Subtypselektivität zu erlangen, ergibt sich aus dem allosterischen Prinzip [35]. Verhält sich ein Modulator an nur einem Subtyp positiv oder negativ kooperativ mit dem physiologischen Agonisten Acetylcholin, während er an den anderen Subtypen neutral kooperativ mit Acetylcholin interagiert, würde die Bindung des endogenen Überträgerstoffs nur an einem Subtyp beeinflusst werden. Der Modulator würde somit eine absolute Subtypselektivität aufweisen.

### ***1.4 Allosterische Modulatoren an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren***

Wie bereits erwähnt, weisen die allosterischen Modulatoren an Muskarinrezeptoren strukturell große Unterschiede auf. Neben Gallamin und Alcuronium, sind es vor allem die Alkan-Bisammonium-Verbindungen mit der Leitsubstanz W84, die in der Vergangenheit in Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen an  $M_2$ -Rezeptoren genauer untersucht wurden. Aufgrund des chemisch relativ einfachen Aufbaus war es möglich, eine Vielzahl von strukturellen Modifikationen am Grundgerüst dieser Verbindungsklasse vorzunehmen (Abb. 1), die im Folgenden besprochen werden sollen.



**Abb. 1** Durchgeführte strukturelle Veränderungen an der Leitstruktur W84

Die schrittweise einseitige Verkürzung von W84 (Entfernung eines lateralen Aromaten und des positiv geladenen Stickstoffs) führt zu einem deutlichen Affinitätsverlust am N-Methylscopolamin(NMS)-besetzten Rezeptor. Zur Interaktion von W84 mit dem Rezeptorprotein ist somit das komplette Molekül notwendig [36, 37].

Ebenso ist ein planarer, hydrophober Rest auf beiden Seiten des Moleküls für die allosterische Wirkung essentiell. Eine schrittweise Sättigung der lateralen Phthalimidreste führt ebenfalls zu einem deutlichen Wirkungsverlust am NMS-besetzten Rezeptor. Der komplette Abbau eines Ringsystems führt zu einem Affinitätsverlust von ca. 2,5 Dekaden im Vergleich zur Ausgangsverbindung [38, 39].

Der optimale Abstand der beiden positiven Ladungen des Moleküls beträgt 10 Å. Die aliphatische Kette zwischen den quartären Stickstoffen besteht somit idealerweise aus sechs bis sieben Methylengruppen, wobei die Verbindung C<sub>7</sub>/3 phth mit sieben Methylengruppen in der Zwischenkette eine noch ca. 3-fach höhere Affinität aufweist als W84. Eine Verkürzung der Zwischenkette auf bis zu drei Methylengruppen hat eine drastische Senkung der Wirksamkeit zur Folge. Eine weitere Verlängerung über sieben Methylengruppen hinaus führt zu keiner zusätzlichen Steigerung der Affinität [40].

Durch einen Austausch der Sauerstoffatome der Phthalimidfunktionen durch Hydroxy-, Alkoxy-, oder Phenylsubstituenten wird keine große Veränderung der Affinität erreicht. Ein Austausch gegen eine Benzylidengruppe führt hingegen zu

einer Steigerung der Affinität um über eine Dekade [41]. Die Wirksamkeit der Substanzen hängt also unter anderem von einer hohen Polarisierbarkeit und der Anwesenheit einer Doppelbindung am Kohlenstoff ab.

Der Austausch eines quartären Stickstoffs gegen ein Silizium-Atom führt zu Substanzen, die mit [ $^3\text{H}$ ]N-Methylscopolamin ([ $^3\text{H}$ ]NMS) positiv kooperativ interagieren [42]. Diese Substanzen besitzen eine höhere Affinität zum NMS-besetzten als zum freien Rezeptor und steigern somit die NMS-Gleichgewichtsbindung. Ein Austausch beider Stickstoffe gegen Silizium führt allerdings zu einem kompletten Wirkungsverlust. Es ist also mindestens ein positiv geladener Stickstoff für die allosterische Wirkung notwendig. Es spielt dabei allerdings keine große Rolle, ob dieser Stickstoff eine permanente positive Ladung trägt oder nicht, da auch die tertiären Derivate bei einem pH von 7,3, wie er in den Experimenten eingesetzt wird und welcher dem physiologischen pH-Milieu entspricht, zum großen Teil protoniert vorliegen und somit keinen Wirkungsverlust aufweisen [43].

Durch Variation des lateralen Aromaten bzw. durch geeignete Substitution des Phthalimids lässt sich die Affinität am deutlichsten steigern. Durch beidseitige Methylierung des Ringsystems von W84 erhält man den allosterischen Modulator Dimethyl-W84, dessen tritiiertes Derivat der bisher einzige eingesetzte allosterisch wirksame Radioligand an Muskarinrezeptoren ist [44]. Dimethyl-W84 hat eine um nahezu eine Dekade höhere Affinität als W84. Die Vergrößerung des aromatischen Systems und damit eine Vergrößerung der lipophilen Kontaktfläche zur Bindungsstelle führt ebenfalls zu deutlich höher affinen Verbindungen [45, 46]. Am geeignetsten stellte sich dabei die Vergrößerung auf Naphthalimid heraus. Die Verbindung WB64 mit beidseitigem Naphthalimidringsystem zeigt im Vergleich zu W84 eine um zwei log Einheiten gesteigerte Affinität [47].

Eine Dimethylierung der Seitenkette führt zu einer Steigerung der Affinitäten um ca. eine Zehnerpotenz. Außerdem wird dadurch die Kooperativität mit NMS vom negativen auf ein neutrales Niveau gehoben. Kombiniert mit einer Veränderung des lateralen Ringsystems (Methylierung oder Vergrößerung auf Naphthalimid) erhält man mit NMS positiv kooperative Substanzen [47, 48]. Mit der Verbindung Naphmethonium, die neben einem Naphthalimidringsystem eine Dimethylierung in der Seitenkette beinhaltet, wurde der momentan potenteste allosterischer Modulator

der Alkan-Bisammonium-Reihe entwickelt, der zusätzlich positive Kooperativität mit NMS zeigt [47].

## 1.5 Fragestellung

Ausgehend von den bisher besprochenen Verbindungen wurden weitere Strukturveränderungen am Grundgerüst der Alkan-Bisammonium-Verbindungen vorgenommen und im Rahmen dieser Arbeit an  $M_2$ -Rezeptoren aus Schweineherzventrikelgewebe untersucht, um einen tieferen Einblick in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser Substanzklasse zu erhalten (Alle in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen sind sowohl im Abschnitt 2.4.2 als auch auf einer Klappseite am Ende der Arbeit aufgeführt). Da bisher nur Verbindungen mit einer Dimethylierung der Seitenkette getestet wurden, stellte sich die Frage, ob eine Monomethylierung der Seitenkette den gleichen Effekt haben würde. Hierzu wurden die Substanzen MM5A und MM4A untersucht, welche ein- bzw. beidseitig monomethylierte Derivate von W84 darstellen. Daneben wurden die Substanzen MM5B und MM4E getestet, die neben einer ein- bzw. beidseitigen Monomethylierung der Seitenkette noch zusätzlich ein- bzw. beidseitig eine Methylgruppe am Phthalimidringsystem tragen, um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse, die man mit den Phthalimiderivaten erhalten hat, auch auf Methylphthalimid-Substanzen übertragen lassen.

Alle bisherigen Untersuchungen fanden mit methylsubstituierten Verbindungen statt. Mit den Substanzen MM4F, MM4G und MM4H wurden von Herrn Dr. M. Muth aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. U. Holzgrabe erstmals beidseitig monoalkylierte Verbindungen mit längerkettigen Substituenten in den Seitenketten synthetisiert. Um zu sehen, ob durch eine Vergrößerung der Substituenten eine weitere Steigerung der Affinität erreicht werden kann, und um die optimale Größe der Substituenten zu finden, wurden bei den genannten Verbindungen Ethyl-, Propyl- und Isobutylgruppen eingebracht.

Alle Naphthalimid-Derivate der Alkan-Bisammonium-Verbindungen zeigen Fluoreszenz. Diese Eigenschaft kann durch eine zusätzliche Substitution des Naphthalimids mit einer Aminogruppe verstärkt werden. Diese erhöhte Fluoreszenz könnte evtl. in

zukünftigen Bindungsuntersuchungen analytisch ausgenutzt werden [49] und somit könnte vielleicht ein Teil der Radioligandbindungsuntersuchungen eingespart werden. Neben einer aminierten Verbindung (MM3J) wurden auch zwei Synthesevorstufen der Substanz, die anstelle der Aminogruppe eine Nitrogruppe in Position 3 und 4 des Naphthalimids tragen (MM3L, MM3M), daraufhin untersucht, ob die Substituenten einen störenden oder gegebenenfalls sogar steigernden Effekt auf die Affinität der Verbindung ausüben. Die Nitro-substituierten Derivate zeigen jedoch, wie aus chemischer Sicht zu erwarten war (-M-Effekt), im Vergleich zur Ausgangsverbindung keine gesteigerte Fluoreszenz.

Im Hinblick auf Substanzen, die eventuell in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) z.B. zur Markierung muskarinischer Rezeptoren im ZNS Verwendung finden könnten, wurde ein W84-Grundgerüst mit zwei lateralen Naphthalimidringsystemen dahingehend verändert, dass eine tertiäre Verbindung synthetisiert wurde, die an einem Stickstoff einen Fluorethylrest beinhaltet (TDF). Der zweite Stickstoff wurde durch ein dimethyliertes Silizium ersetzt. Dadurch wird dem Molekül ein permanent positiv geladenes Zentrum entzogen, was zu einem Anstieg der Lipophilie der Substanz führt. Somit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Substanz die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Zum Vergleich wurde das bistertiäre Analogon MM8A sowie die am Stickstoff unsubstituierte Siliziumverbindung TDH<sub>2</sub> untersucht.

Neben den bisher genannten W84-Derivaten, die sich hauptsächlich durch Einfügen von Substituenten am Grundgerüst, Veränderung der lateralen Ringsysteme oder Atomaustausch von der Ausgangsverbindung unterscheiden, wurden noch zwei weitere Abkömmlinge des W84 untersucht, deren Grundgerüst stärker verändert wurde. Bei der Verbindung MM7A handelt es sich um ein „halbiertes“ Naphmethonium, das die affinitäts- und kooperativitätsbestimmenden Strukturmerkmale (Naphthalimidringsystem und Seitenkettenmethylierung) der Mutterverbindung enthält. Die Verbindung RP25 enthält Seitenketten, welche um einen Kohlenstoff verlängert und mit jeweils einer Dreifachbindung versehen sind. Die Substanz RP25 enthält somit Seitenketten, welche im Vergleich zu Propylseitenketten eine relativ große Starrheit aufweisen.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden strukturvariierte Alkan-Bisammonium-Verbindungen an den fünf humanen muskarinischen Rezeptorsubtypen untersucht, welche aus stabil transfizierten CHO-Zellen gewonnen wurden. Mittels der radioaktiv markierten Sonde [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS) wurde in kinetischen und

Gleichgewichtsbindungsexperimenten die Affinität der Substanzen zum NMS-besetzten und zum freien Rezeptor bestimmt. Ausgangspunkt war die von den bis jetzt bekannten Substanzen wirksamste Verbindung Naphmethonium. Es stellte sich heraus, dass diese Substanz im Vergleich zu W84 nicht nur eine höhere Affinität zum  $M_2$ -Rezeptor hat, sondern dass durch die strukturellen Veränderungen auch die Spanne der Subtypselektivität vergrößert wurde. Um zu klären, auf welche der strukturellen Veränderungen dies zurückzuführen ist, wurden zum Einen die Verbindungen WB41 und WB37 mit strukturell modifizierten lateralen Ringsystemen, aber ohne Seitenkettenmethylierung, untersucht. Zum Anderen wurden die korrespondierenden Verbindungen mit einer Dimethylierung der Seitenkette OS30 und OS72 getestet. Die tertiäre Substanz MM8A und ihr quartäres Analogon WB64, die jeweils beidseitig ein Naphthalimid tragen, wurden eingesetzt, um die Frage zu erörtern, welchen Einfluss der Substitutionsgrad an den zentralen Stickstoffen der Verbindungen auf das Ausmaß und die Reihenfolge der Subtypselektivität hat.

Schließlich wurde in orientierenden Versuchen die Kooperativität der Substanz Naphmethonium mit Acetylcholin an den fünf Subtypen der Muskarinrezeptoren abgeschätzt. In vorangegangene Studien an  $M_2$ -Rezeptoren wurde bereits gezeigt, dass Naphmethonium einen stark negativ kooperativen Effekt auf die Bindung von Acetylcholin ausübt [50]. Die durchgeführten Versuche dienten dazu, die Interaktion von Naphmethonium und Acetylcholin an allen Muskarinrezeptorsubtypen zu bestimmen.

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Herstellung von Membransuspensionen***

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden zum einen an Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikeln durchgeführt. Zum anderen wurde mit Membransuspensionen gearbeitet, die aus den Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) gewonnen wurden. Die Herstellung der jeweiligen Membransuspensionen ist im Folgenden dargestellt.

#### **2.1.1 Membransuspension aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins**

Die zur Membranpräparation verwendeten Schweineherzen stammten von frisch geschlachteten Tieren und wurden vom Schlachthof Köln zur Verfügung gestellt. Nach einem Transport auf Eis wurden die Herzen anschließend in einer Kühlkammer bei 4°C weiterverarbeitet. Die Ventrikel wurden von den Vorhöfen und dem übrigen Herzgewebe getrennt und anschließend zu Portionen à ca. 40 g in Gefrierbeuteln bei –80°C eingefroren. Alle weiteren Schritte der Membranherstellung wurden ebenfalls in einer Kühlkammer bei 4°C durchgeführt. Das verwendete Stück der Herzkammerwand wurde leicht angetaut, mit einem Wiegemesser möglichst fein zerkleinert und zweimal mit ca. 20 ml Saccharoselösung 0,32 M gespült. Die gereinigten Gewebeteile wurden in ca. 400 ml Saccharoselösung 0,32 M aufgenommen und mittels eines Waring-Blendor-Homogenisators (G24, Beschreibung siehe 2.4) zerkleinert (fünfmal im Abstand von 30 s jeweils 10 s auf Stufe „high“). Die erhaltene Suspension wurde mit Saccharoselösung 0,32 M auf ca. 800ml aufgefüllt und mit Hilfe eines Potter Elvehjem Glashomogenisators (5 Hübe bei 1750 U/min; G10) in kleinen Portionen weiterverarbeitet. Die homogenisierte Suspension wurde in einer Ultrazentrifuge (G3) bei 2000 U/min 11 min lang zentrifugiert, um sie von Schwebstoffen zu reinigen. Der Überstand wurde erneut bei

32000 U/min für 41 min zentrifugiert, die erhaltenen Pellets in ca. 120 ml Aqua dest. aufgenommen und mittels des Potter Elvehjem-Homogenisators resuspendiert. Die Suspension wurde auf Eppendorf-Reaktionsgefäße (V5) zu je 1 ml verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.1.2 Membransuspension aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO)**

Die Versuche zur Subtypselektivität der verwendeten Substanzen wurden an Membranen aus CHO-Zellen durchgeführt. Die Zellen waren dankenswerterweise von Prof. Dr. G. Lambrecht vom Biozentrum Niederursel der Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt worden. Die Zellen sind jeweils mit dem entsprechenden humanen Muskarinrezeptor-Gen der Subtypen 1 bis 5 stabil transfiziert. Die Methoden zur Heranzüchtung der Zellen sowie die Membrangewinnung sind im Folgenden dargestellt.

#### **2.1.2.1 Zellkultur**

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen fanden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (G8) statt. Die CHO-Zellen wurden in Kulturschalen (V3) in einem Nährmedium F-12 mit 0,2 mg/ml G418, 90 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 1 mM Glutamin (L3) kultiviert. Die Inkubation fand in einer Atmosphäre von 96% Luftfeuchtigkeit mit 5%  $\text{CO}_2$ -Gehalt bei einer Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  statt (G23). Alle 2-3 Tage wurden die Zellen bei Konfluenz vermehrt. Hierzu wurde das alte Nährmedium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml Phosphatpuffer (L4) gespült und die Zellen anschließend mit Trypsin-EDTA-Lösung (R23) nach einer kurzen Inkubationszeit (ca. 3 min) abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 900 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  4 Minuten zentrifugiert (G2, Rotor JS 4.3), das erhaltene Pellet in frischem Nährmedium aufgenommen und gleichmäßig auf mehrere neue Kulturschalen verteilt. Die Vermehrung der Zellen folgte folgendem Schema:  $1 \rightarrow 5 \rightarrow 21$  Schalen. Hiervon wurden 20 Schalen zur Membrangewinnung herangezogen und die verbleibende Schale erneut vermehrt.



### **Einfrieren von Zellen**

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die CHO-Zellen in 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)-haltigem Nährmedium in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurde das Nährmedium der Kulturschalen abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml Phosphatpuffer (L4) gespült und der Zellrasen mit Trypsin-EDTA-Lösung (R23) nach einer Inkubationszeit von ca. 3 Minuten abgelöst. Das trypsinhaltige Nährmedium wurde abzentrifugiert (900rpm, 4°C, 4 min, G2, Rotor JS 4.3) und das Pellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Je Cryotube (V4) wurden 100 µl DMSO vorgelegt und mit 900 µl Zellsuspension aufgefüllt. Die CHO-Zellen einer Kulturschale wurden so auf 1-4 Cryotubes verteilt und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert.

### **Auftauen von CHO-Zellen**

Sollten Zellen neu in Kultur gebracht werden, wurde der Inhalt eines Cryovials schnell per Hand erwärmt. Die DMSO-haltige Zellsuspension wurde schnellstmöglich in 10 ml Nährmedium verdünnt, um die Zellen nicht unnötig der schädigenden Wirkung des DMSO auszusetzen und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Kulturschale gegeben. Bis die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurde das Nährmedium alle 2-3 Tage gewechselt. Anschließend konnten die Zellen wie unter 2.1.2.1 beschrieben vermehrt werden.

#### **2.1.2.2 Membranpräparation aus CHO-Zellen**

Zeigten die Zellen 18 Stunden vor Beginn der Membranpräparation eine Konfluenz von mindestens 80% wurde das vorhandene Medium abgesaugt und durch sterilfiltriertes butyrathaltiges Medium ersetzt (15,5 ml Butyrat-Stammlösung auf 310 ml Nährmedium, L5), um die Expressionsrate der muskarinischen Rezeptoren zu erhöhen. Am Tag der Membranpräparation wurde das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 2,4 ml auf Eis gekühltem Präparationspuffer 1 (L7) benetzt und schließlich mittels eines Zellschabers (V14) von der Oberfläche der Kulturschalen entfernt. Die Zellsuspension von jeweils 5 Kulturschalen wurde in einem Zentrifugengläschen gesammelt, auf Eis gelagert und die Schalen mit weiteren 6 ml kaltem Puffer 1 (L7) gespült. Die gesammelte Suspension wurde mit Hilfe eines

Polytron-Zerkleinerers (G12) aufgeschlossen (jeweils zweimal im Abstand von 2 Minuten für 10 Sekunden auf Stufe 6, G11) und im Anschluss bei 40000 g und 2°C 10 Minuten zentrifugiert (G2, Rotor JA 25,50). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets wurden in je 10 ml Puffer 2 (L8) resuspendiert und der Zentrifugationsschritt zweimal wiederholt. Die so gereinigten Pellets wurden in 9 ml Puffer 2 aufgenommen, auf Eppendorf-Reaktionsgefäße zu 300 und 500 µl verteilt und umgehend bei –80°C gelagert.

## **2.2 Proteingehaltsbestimmung der Membransuspensionen**

Der Proteingehalt der verwendeten Membransuspensionen wurde nach der Methode von Lowry [51] ermittelt. Als Standardprotein diente Humanes Serumalbumin (R18).

## **2.3 Radioligandbindungsstudien**

### **2.3.1 Allgemeine theoretische Grundlagen**

Die reversible Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor folgt dem Massenwirkungsgesetz und kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:



[R]: Konzentration des Rezeptors

[L]: Konzentration des Liganden

[RL]: Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes

$k_{+1}$ : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation

$k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Im Gleichgewicht laufen Hin- und Rückreaktion mit gleicher Geschwindigkeit ab:

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = k_{-1} \cdot [RL] \quad \text{Gleichung 2}$$

Bildet man den Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation ( $k_{-1}$ ) und der Assoziation ( $k_{+1}$ ), erhält man die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$ . Der reziproke Wert ist die Gleichgewichts-Assoziationskonstante  $K_A$ .

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Gleichung 3}$$

Die Dissoziationskonstante  $K_D$  beschreibt diejenige Konzentration des Liganden, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren durch den Liganden besetzt ist, und ist somit ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Ein kleiner Wert für  $K_D$  bedeutet, dass der Ligand eine hohe Affinität zum Rezeptor besitzt.

## 2.3.2 Homologe Konkurrenzexperimente

### 2.3.2.1 Theoretische Grundlagen

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der verwendeten Membranhomogenate wurden homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Ziel war die Bestimmung der Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ) und die Bestimmung der Affinität ( $K_D$ ) des verwendeten Liganden zum Rezeptor. Homologe Konkurrenzversuche sind eine spezielle Form der Inhibitionsversuche, wobei Radioligand und Inhibitor strukturell identisch sind und sich nur durch die radioaktive Markierung unterscheiden. Die Konzentration des Radioliganden wird in diesen Experimenten konstant gehalten, die Konzentration des unmarkierten Liganden schrittweise erhöht. Die Gesamtbindung des Radioliganden am Rezeptor wird in Abwesenheit des unmarkierten Liganden ermittelt. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wird der Radioligand mit einem Überschuss eines strukturverschiedenen spezifischen Liganden für den Rezeptor inkubiert, wodurch der Radioligand von seiner Bindungsstelle abgehalten wird. Die gemessene Bindung

wird halblogarithmisch gegen die Ligandkonzentration aufgetragen und kann computergestützt mittels nichtlinearer Regressionsanalyse unter Verwendung der „Vier Parameter Logistischen Gleichung“ [52] ausgewertet werden. Das untere Plateau der Kurve zeigt das Niveau der nicht-sättigbaren Radioligand-Bindung an und ist typischerweise identisch mit der unspezifischen Radioligand-Bindung (s.o.). Das Steigungsmaß (n) dieser Gleichung entspricht dem Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ) aus der Hill-Gleichung [53]:

$$B_{\text{ges}} = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + (\text{IC}_{50}/10^{[X]})^n} \quad \text{Gleichung 4}$$

- $B_{\text{ges}}$ : Gesamtbindung des Radioliganden
- Min: Unteres Kurvenplateau (Gesamtbindung in Anwesenheit hoher Konzentrationen des unmarkierten Liganden)
- Max: Oberes Kurvenplateau (Gesamtbindung in Abwesenheit des unmarkierten Liganden)
- $\text{IC}_{50}$ : Ligandkonzentration, die die sättigbare spezifische Bindung des Radioliganden um 50 Prozent reduziert (Wendepunkt der Kurve)
- [X]: Konzentration des nicht radioaktiv markierten Liganden
- n: Maß für die Kurvensteilheit (analog dem Hill-Koeffizienten)

Der Wendepunkt der Kurve entspricht dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert und gibt die Konzentration des Inhibitors an, die die sättigbare spezifische Bindung des Radioliganden auf die Hälfte reduziert. Ist das bei dieser Analyse erhaltene Steilheitsmass (n) nicht signifikant unterschiedlich von  $-1$ , kann man von einer 1:1 Interaktion des Liganden mit einer einheitlichen Rezeptorpopulation ausgehen. Nach der Gleichung von Cheng und Prussoff [54] kann daraus folgend die Inhibitionskonstante  $K_i$  berechnet werden, wobei die Ligandkonzentration [L] und die Dissoziationskonstante  $K_D$  des Radioliganden bekannt sein müssen. Zudem muss die Reaktion dem Massenwirkungsgesetz der oben beschriebenen Form gehorchen und das Reaktionsgleichgewicht erreicht sein.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung 5}$$

$K_i$  steht für die Affinität des Inhibitors zu den verwendeten Rezeptoren und ist im Vergleich zu  $IC_{50}$  ein vom verwendeten Radioliganden unabhängiges Affinitätsmaß.  $[L]$  bezeichnet die Konzentration des Radioliganden und  $K_D$  seine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante. Im Fall einer homologen Kompetition sind der Ligand und der Inhibitor strukturgleich und  $K_i$  entspricht somit  $K_D$ , wodurch sich die Gleichung wie folgt vereinfachen lässt:

$$K_D = K_i = IC_{50} - [L] \quad \text{Gleichung 6}$$

$B_{\max}$  ist die Konzentration der in der Membransuspension vorhandenen Bindungsstellen und setzt sich aus der Zahl der freien Rezeptoren und der Zahl der Ligand-Rezeptor-Komplexe zusammen.  $B_{\max}$  kann nach DeBlasi et al. [55] aus dem Massenwirkungsgesetz und Gleichung 5 wie folgt bestimmt werden:

$$B_{\max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad \text{Gleichung 7}$$

Dabei ist  $B_0$  die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des unmarkierten Inhibitors,  $[L]$  die Konzentration des Radioliganden und  $IC_{50}$  diejenige Konzentration des Inhibitors, bei der 50 % aller Rezeptoren besetzt sind.

Eine weitere Methode zur Bestimmung von  $K_D$  und  $B_{\max}$  beruht auf der Sättigungsisotherme nach Langmuir, die nach entsprechender Umformung die Basis der Scatchard-Auftragung (s.u.) bildet:

$$[RL] = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad \text{Gleichung 8}$$

$[RL]$  steht für die Konzentration an vorhandenen Ligand-Rezeptor-Komplexen,  $[L]$  für die Konzentration an ungebundenem Liganden. Durch die Sättigungsisotherme lässt

sich folglich die Konzentration an gebundenem Liganden in Abhängigkeit der Ligandkonzentration berechnen. Durch Umformung erhält man eine Gleichung zur Berechnung der fraktionellen Rezeptorbesetzung:

$$\frac{[RL]}{B_{\max}} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad \text{Gleichung 9}$$

Die fraktionelle Rezeptorbesetzung gibt den Anteil der Rezeptoren an, die durch den Liganden besetzt sind. Sie ist abhängig von der Radioligandkonzentration  $[L]$  und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$ , also der Affinität des Liganden zum Rezeptor.

Eine Linearisierung der Langmuir'schen Sättigungsisotherme (Gl. 8) stellt die Umformung nach Scatchard [56] dar.

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{B_{\max} - [RL]}{K_D} = -\frac{1}{K_D} [RL] + \frac{B_{\max}}{K_D} \quad \text{Gleichung 10}$$

Zur graphischen Auswertung wird die spezifische Bindung des Radioliganden  $[RL]$  gegen den Quotienten aus spezifischer Bindung und freier Radioligandkonzentration  $[RL]/[L]$  aufgetragen. Der Schnittpunkt der resultierenden Gerade mit der X-Achse entspricht  $B_{\max}$ , die Steigung der Geraden ist der negative Kehrwert von  $K_D$ . Für die Auswertung nach Scatchard müssen laut Bennett und Yamamura [57] folgende Bedingungen gelten:

1. Das Bindungsverhalten muss dem Massenwirkungsgesetz folgen.
2. Es muss eine einheitliche Rezeptor- und Ligandpopulation vorliegen.
3. Es müssen Gleichgewichtsbedingungen vorherrschen.
4. Die unspezifische Bindung muss ermittelt werden.
5. Es dürfen maximal 10% des eingesetzten Radioliganden an Rezeptoren gebunden werden, sodass die freie Ligandkonzentration als konstant angesehen werden kann. Dies gilt darüber hinaus auch für unmarkierte Substanzen.

### 2.3.2.2 Versuchsdurchführung

Zur Charakterisierung der eingesetzten Membransuspensionen wurden homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Es wurden sowohl die Affinität ( $K_D$ ) des muskarinischen Antagonisten [ $^3\text{H}$ ]N-Methylscopolamin ([ $^3\text{H}$ ]NMS) zum jeweiligen Muskarinrezeptor als auch die Dichte der spezifischen Bindungsstellen ( $B_{\text{max}}$ ), sowohl für die Membranpräparationen aus Schweineherz als auch für die CHO-Zellmembransuspensionen bestimmt. Da sich die Versuchsdurchführungen hierfür unterscheiden, werden sie im Folgenden getrennt besprochen.

#### Charakterisierung der Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein

Die Versuche zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Membransuspensionen aus Schweineherz wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt, wobei Reaktionsansätze von jeweils 1500  $\mu\text{l}$  untersucht wurden. Die Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Reihenfolge des Zupipettierens der einzelnen Komponenten erfolgte gemäß dem unten aufgeführten Schema.

Zugefügtes Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Art der zugeführten Lösung
100	Wässrige [ $^3\text{H}$ ]NMS-Lösung
50	Aqua dest. (Gesamtbdg.) bzw. wässrige Atropinlösung $3 \times 10^{-5}$ M (unspez. Bdg.) bzw. Ligand-Verdünnungsreihe in Wasser
1100	Mg, Tris, Cl, $\text{P}_i$ -Puffer (L1)
250	Homogenat in Wasser

**Tab. 1** Pipettierschema für den Ansatz der homologen Konkurrenzversuche mit Homogenaten vom Herzventrikelgewebe des Hausschweins

Die Konzentration des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS im Ansatz betrug 0,2 nM. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde der muskarinische Antagonist Atropin in einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M verwendet. Das frisch aufgetaute Homogenat wurde mit Aqua dest. auf das gewünschte Volumen verdünnt und bis zur Zugabe mit einem Magnetrührer in Suspension gehalten.

Nach dem Pipettieren des Versuchsansatzes wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße verschlossen, einzeln kurz geschüttelt (G9) und anschließend in ein auf 37°C vorgewärmtes Wasserbad (G6) gestellt. Hier wurde bis zum Erreichen des Gleichgewichts zwei Stunden unter ständigem Schütteln inkubiert.

Im Anschluss wurde jedes Reaktionsgefäß einzeln erneut geschüttelt (G9), vom Reaktionsansatz 1 ml entnommen, mittels Vakuumfiltration an Handfiltrationsanlagen über Glasfaserfilter (V15) filtriert und jeder Filter je zweimal mit 5 ml eisgekühltem Aqua dest. gespült. Die Filter wurden in ein Szintillationsgefäß (V2) überführt und mit 5ml Szintillationscocktail (R3) versetzt. Nach einer mindestens einstündigen Inkubation, in der die Filter und Gewebefragmente aufgelöst werden, wurde die in der Probe enthaltene Radioaktivität mit Hilfe eines Flüssigkeits-Szintillationszählers (G1) bestimmt.

### Charakterisierung der aus CHO-Zellen gewonnenen Homogenate

Sämtliche Versuche mit Membransuspensionen, die aus CHO-Zellen gewonnen wurden, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels eines Harvesters 96® (G18) durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass im Vergleich zu Versuchen an Handfiltrationsanlagen wesentlich geringere Mengen an Membran, Radioligand und Testsubstanzen eingesetzt werden müssen. Als Reaktionsgefäße dienten für alle Versuche 96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen (V1). Es fand jeweils eine dreifache Bestimmung der Werte statt. Für homologe Wettbewerbsversuche wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Reihenfolge der Zugabe	Zugefügtes Volumen [µl]	Art der zugefügten Lösung
1.	10	Aqua dest. (Gesamtbdg.) bzw. wässrige Atropinlösung $3 \times 10^{-5}$ M (unspez. Bdg.) bzw. NMS-Verdünnungsreihe in Wasser
2.	20	Wässrige [ $^3\text{H}$ ]NMS-Lösung
	250	Mg, Tris, Cl, $\text{P}_i$ -Puffer (L1)
	30	Homogenat ( $\text{M}_1$ - $\text{M}_5$ ) in HEPES-Lagerungspuffer (L8)

**Tab. 2** Pipettierschema für den Ansatz der homologen Wettbewerbsversuche mit Membransuspensionen aus CHO-M<sub>1</sub>- bis M<sub>5</sub>-Zellen.



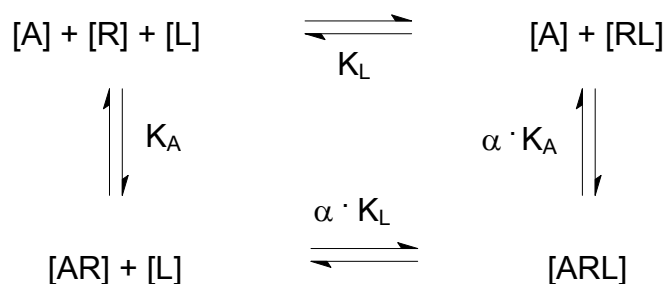
Die unter 1. angegebenen Lösungen wurden in die Mikrotiterplatte vorgegeben. Ein Vielfaches der unter 2. angegebenen Lösungen wurde vor der Zugabe vereinigt, gemischt und davon wurden anschließend mittels einer Multipipette (G22) jeweils 300 µl in die Bohrungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Schweineherzhomogenaten an den Handfiltrationsanlagen ist zu beachten, dass die eingesetzten Konzentrationen der NMS-Verdünnungsreihe hier nicht einer 1:3- sondern einer 1:3,1-Verdünnung unterliegen, da mit der Multipipette nur Volumina von 300 µl pipettiert werden konnten. Dieser Unterschied ist allerdings zu vernachlässigen und wird im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Die [<sup>3</sup>H]NMS-Endkonzentration betrug 0,4 nM. Die Radioligandkonzentration wurde im Vergleich zu Versuchen an Schweinherzventrikelhomogenat zur Vergrößerung des Signals der spezifischen Bindung erhöht. Die aufgetauten CHO-Zellmembransuspensionen wurden in Aqua dest. auf das benötigte Volumen verdünnt und dem Versuchsansatz zugeführt. Der fertige Versuchsansatz wurde mit Parafilm® M (V9) abgedichtet, auf einem Rotationsmischer (G9) geschüttelt und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden so gewählt, dass sie immer mindestens das Fünffache der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationshalbwertszeit des jeweiligen Rezeptorsubtyps unter Kontrollbedingungen betragen. Nach der Inkubation wurden alle Proben gleichzeitig mittels des Harvesters 96® (G18) über eine Filtermatte (V11) filtriert. Die Filtermatte, die vor der Filtration zur Reduzierung der unspezifischen Bindung 30 Minuten in 0,1%-iger Polyethylenimid-Lösung (R22) eingelegt wurde, wurde im Anschluß einmal mit Aqua dest. von 4°C gespült. Eine Trocknung des Filters erfolgte initial auf einem Heizblock (G20). Anschließend wurde der Filter in einer Mikrowelle (G19) für 3 Minuten bei 400 W getrocknet. Um eine Messung der Radioaktivität möglich zu machen, wurde auf der getrockneten Filtermatte eine Wachsplatte (V10) geschmolzen, die Feststoffsintillatoren enthält. Die derart gesinterte Filtermatte mit dem wiedererstarteten Wachs wurde in eine Klarsichthülle (V12) gegeben und in einer Zählkassette (V13) in den Szintillationszähler (G17) überführt, in welchem die Radioaktivität mittels Szintillationsspektroskopie gemessen wurde.

### 2.3.3 Heterologe Interaktionsexperimente

#### 2.3.3.1 Theoretische Grundlagen

Mit heterologen Interaktionsexperimenten kann die Affinität einer Testsubstanz, im Fall der vorliegenden Arbeit eines allosterischen Modulators, zum freien und zum Orthoster-besetzten Rezeptor ermittelt werden. Der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  bezeichnet das Verhältnis dieser beiden Affinitäten zueinander. In dem Maße, wie die Orthosterbindung die Affinität des Alloster verschiebt, verändert sich gleichgerichtet und im selben Ausmaß durch die Alloster-Bindung die Affinität des Orthosters. Die Kooperativität ist also ein Maß für die gegenseitige Beeinflussung der Affinität zur jeweiligen Bindungsstelle von Ligand und allosterischem Modulator. In heterologen Interaktionsexperimenten wurde hier ein radioaktiv markiertes Orthoster in fixer Konzentration mit nicht markiertem Alloster in steigender Konzentration versetzt.

Binden zwei strukturell unterschiedliche Substanzen am gleichen Rezeptor an zwei verschiedene Stellen, so können im Reaktionsgleichgewicht drei Arten von Rezeptor-Ligand-Komplexen beschrieben werden [58]. Man spricht vom ternären Kooperativitätsmodell:



[R]: Konzentration an freien Rezeptoren

[L]: Konzentration des orthosterischen Liganden

[A]: Konzentration des allosterischen Liganden

[AR], [RL], [ARL]: Konzentration der jeweiligen Wirkstoff-Rezeptorkomplexe

$K_L$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des orthosterischen Liganden

$K_A$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Liganden

$\alpha$ : Kooperativitätsfaktor

Ein konventioneller Agonist oder Antagonist bindet für gewöhnlich an die orthosterische Bindungsstelle. Allosterische Modulatoren verwenden hingegen ein anderes Bindungsareal, die sog. allosterische Bindungsstelle. Die Affinitäten hierfür werden gegenseitig beeinflusst, ausgedrückt im Kooperativitätsfaktor  $\alpha$ . Von negativer Kooperativität ( $p\alpha < 0$ ) spricht man, wenn die jeweiligen Affinitäten der Liganden zum Rezeptor durch allosterische Interaktion abnimmt. Eine entsprechende Zunahme der Affinität wird als positive Kooperativität ( $p\alpha > 0$ ) bezeichnet. Bleiben die Affinitäten unbeeinflusst, spricht man von neutraler Kooperativität ( $p\alpha = 0$ ).

Aus dem ternären Kooperativitätsmodell kann eine Gleichung abgeleitet werden, die der Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_A$  des Allosters und des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  dient [58]:

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_A + \alpha}{K_A + \frac{[A]}{\alpha}}} \quad \text{Gleichung 11}$$

$B_A$ : spezifische Radioligandbindung in Anwesenheit des allosterischen Modulators

$B_0$ : spezifische Radioligandbindung in Abwesenheit des allosterischen Liganden

Dabei entspricht  $[L]$  der Radioligandkonzentration und  $K_L$  der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung von L, die in homologen Kompetitionsexperimenten bestimmt werden kann.  $[A]$  ist die eingesetzte Konzentration des Allosters und  $K_A$  die Gleichgewichtsdissoziationskonstante seiner Bindung.

Es muss sichergestellt sein, dass sich zum Zeitpunkt der Messung die Reaktion im Gleichgewicht befindet. Dazu wird die Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung nach der Gleichung von Lazareno und Birdsall [59] bestimmt:

$$t_{1/2\text{obs}} = t_{1/2\text{off}} \cdot \left( 1 + X \cdot \frac{1}{EC_{0,5\text{diss}}} \right) \quad \text{Gleichung 12}$$

$t_{1/2\text{obs}}$ :	Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung
$t_{1/2\text{off}}$ :	Halbwertszeit der Radioliganddissoziation unter Kontrollbedingungen
X:	Konzentration des allosterischen Modulators
$EC_{0,5\text{diss}}$ :	Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der Radioliganddissoziation führt

Es wird angenommen, dass nach dem Fünffachen der Halbwertszeit ( $t_{1/2\text{obs}}$ ) Gleichgewichtsbedingungen herrschen.

Beim Vorliegen einer annähernd neutral kooperativen Interaktion ( $\alpha = 1$ ) ist die nichtlineare Regressionsanalyse nach Gleichung 11 zur Auswertung der Daten nicht geeignet. In diesen Fällen wird in Gleichung 11 der Term  $K_A$  durch den Term  $EC_{0,5\text{diss}}/\alpha$  ersetzt [42].  $EC_{0,5\text{diss}}$  ist die Konzentration des allosterischen Modulators, die die Dissoziation des Radioliganden halbmaximal reduziert und wird in kinetischen Experimenten ermittelt (siehe 2.3.4).

### 2.3.3.2 Versuchsdurchführung

Heterologe Interaktionsexperimente wurden mit Membransuspensionen aus Schweineherzventrikelmuskulatur an manuellen Filtrationsanlagen, als auch mit Membransuspensionen aus CHO-Zellen, transfiziert mit den fünf humanen muskarinischen Rezeptorsubtypen, an einem Harvester 96<sup>®</sup> (G18) durchgeführt. Da sich die Versuchsansätze unterscheiden, werden sie im Folgenden einzeln beschrieben.

#### Versuchsdurchführung mit Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein

Versuche zur heterologen Interaktion wurden analog zu den homologen Konkurrenzexperimenten durchgeführt. Die Endkonzentration des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS im Ansatz betrug 0,2 nM. Angesetzt wurde je dreifach in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemäß folgendem Schema:

Zugefügtes Volumen [ $\mu$ l]	Art der zugefügten Lösung
100	Wässrige [ $^3$ H]NMS-Lösung
50	Aqua dest. (Gesamtbdg.) bzw. wässrige Atropinlösung $3 \times 10^{-5}$ M (unspez. Bdg.) bzw. Alloster-Verdünnungsreihe in Wasser
1100	Mg, Tris, Cl, $P_i$ -Puffer (L1)
250	Homogenat in Wasser

**Tab. 3** Pipettierschema für die Ansätze für heterologe Interaktionsexperimente mit Homogenaten aus Schweineherzventrikelgewebe.

Bei der Zugabe der Lösungen wurde die in Tab.3 beschriebene Reihenfolge eingehalten. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde Atropin in einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M zugesetzt. Die frisch aufgetaute Membransuspension wurde mit Aqua dest. verdünnt und mit einem Magnetrührer in Suspension gehalten. Der Versuchsansatz wurde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Inkubationszeit zur Erlangung der Gleichgewichtsbindung wurde gemäß Gleichung 12 abhängig vom jeweiligen Alloster und der eingesetzten Konzentration errechnet. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde der Versuch wie unter 2.3.2.2 beschrieben an manuellen Filtrationsanlagen abfiltriert und für die Messung vorbereitet. Die computergestützte Datenanalyse erfolgte gemäß den unter 2.3.3.1 beschriebenen Methoden.

### Versuchsdurchführung mit Homogenaten aus CHO-Zellen

Die heterologen Interaktionsversuche an Homogenaten aus CHO-Zellen wurde in 96-well-Mikrotiterplatten mit dreifach bestimmten Werten durchgeführt. Zur Steigerung des Messsignals für die spezifische Bindung wurde eine Radioligandkonzentration von 0,4 nM [ $^3$ H]NMS eingesetzt.

Reihenfolge der Zugabe	Zugefügtes Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Art der zugefügten Lösung
1.	10	Aqua dest. (Gesamtbdg.) bzw. wässrige Atropinlösung $3 \times 10^{-5}$ M (unspez. Bdg.) bzw. Alloster-Verdünnungsreihe
2.	20	Wässrige [ $^3\text{H}$ ]NMS-Lösung
	250	Mg, Tris, Cl, $\text{P}_i$ -Puffer (L1)
	30	Homogenat (CHO $\text{M}_1$ bis $\text{M}_5$ )

**Tab. 4** Pipettierschema für die Ansätze für heterologe Interaktionsexperimente mit Membransuspensionen aus CHO-Zellen

Der Versuchsansatz hat ein Endvolumen von 310  $\mu\text{l}$ . Die Verdünnungsreihen unterliegen somit, wie bei der homologen Konkurrenz, einem Verdünnungsfaktor von 31 statt 30, was zu vernachlässigen ist und im Folgenden nicht weiter berücksichtigt wird. Zuerst wurden in die 96-well-Mikrotiterplatten 10  $\mu\text{l}$  Aqua dest. für die Gesamtbindung, wässrige Atropinlösung ( $10^{-6}$  M Endkonzentration) zur Ermittlung der unspezifischen Bindung oder der Alloster-Verdünnungsreihe gegeben. Die in Tab. 4 unter 2. aufgeführten Lösungen wurden zunächst in einem größeren Ansatz gemischt und anschließend je 300  $\mu\text{l}$  der Mischung in die Vertiefungen pipettiert. Die Errechnung der Inkubationszeiten erfolgte für jeden Rezeptorsubtyp, für jedes Alloster und für jede Konzentration gemäß Gleichung 12. Nach Ende der Inkubation bei 37°C wurde wie in 2.3.2.2 angegeben mit einem Harvester 96® abfiltriert und der Filter für die Messung präpariert. Die Analyse der Daten erfolgte gemäß 2.3.3.1. Zur Zusammenfassung wurden die aus mehreren Einzelversuchen gewonnenen Kenngrößen gemittelt. Zur graphischen Darstellung wurde zu den erhaltenen Konzentrationswerten anhand der gemittelten Parameter eine Kurve generiert.

## 2.3.4 Heterologe Konkurrenzexperimente mit Acetylcholin und [ $^3\text{H}$ ]NMS in An- und Abwesenheit eines Allostere

### 2.3.4.1 Theoretische Grundlagen

Neben den heterologen Interaktionsexperimenten, bei denen die verwendeten Membranen mit einer konstanten Konzentration [ $^3\text{H}$ ]NMS und steigenden Konzentrationen eines allosterischen Modulators inkubiert wurden, wurden auch

heterologe Konkurrenzexperimente mit [<sup>3</sup>H]NMS und Acetylcholin in An- und Abwesenheit eines Allosters durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, die Wirkung des verwendeten allosterischen Modulators auf die Bindung des Agonisten Acetylcholin (ACh) zu bestimmen. Hierzu wurden die rezeptorhaltigen Membranen mit einer konstanten Konzentration des Radioliganden, einer konstanten Konzentration des allosterischen Modulators und aufsteigenden Konzentrationen des Agonisten inkubiert. Die Inkubationszeit wurde wie unter 2.3.2.1 beschrieben errechnet. Eine Auswertung erfolgt unter Verwendung der „Vier Parameter Logistischen Gleichung“ wie unter 2.3.2.1 beschrieben, indem die spezifische Radioligandbindung halblogarithmisch gegen die Konzentration des eingesetzten Agonisten aufgetragen wird. Der Wendepunkt der errechneten Kurve entspricht dem IC<sub>50</sub>-Wert, der die Konzentration des Agonisten darstellt, welche die spezifische Radioligandbindung auf die Hälfte reduziert. Ein Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte der Kontrollkurve mit den Werten in Anwesenheit des allosterischen Modulators gibt Aufschluss über die Wirkung des Modulators auf die Bindung des Agonisten. Eine Verringerung der Agonistbindung durch das Alloster liegt bei einer Rechtsverschiebung der Kurve (Erhöhung des IC<sub>50</sub>) vor. Bei einer Linksverschiebung (Erniedrigung des IC<sub>50</sub>) wird die Agonistbindung durch das Alloster erhöht.

Zur Zusammenfassung mehrerer Einzelerperimente wurden die jeweils gewonnenen Bindungsparameter IC<sub>50</sub> gemittelt und zur graphischen Darstellung anhand des gemittelten Parameters und der Konzentrationswerte eine Kurve generiert.

Mit Hilfe der so ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte können über eine Auswertung mittels Schild-Auftragung die K<sub>B</sub>-Werte des Allosters ermittelt werden, welche ein Maß für seine Affinität zum unbesetzten Rezeptor darstellen und mit den unter 2.3.3.1 beschriebenen K<sub>A</sub>-Werten übereinstimmen sollten. Hierzu ist die Berechnung des DR (dose ratio) notwendig:

$$DR = \frac{IC_{50, \text{Alloster}}}{IC_{50, \text{Kontrolle}}} \quad \text{Gleichung 13}$$

Zur Bestimmung von DR wird vorausgesetzt, dass die beiden Konzentrations-Effekt-Kurven (Kontrolle und Alloster) die gleiche Steigung haben, also eine parallele Verschiebung vorliegt. Zur graphischen Auswertung nach Arunlakshana und Schild [60] wird  $\log(DR-1)$  gegen die logarithmierte Konzentration des eingesetzten

Allosters aufgetragen. Erhält man hieraus eine Gerade mit der Steigung 1, ist die Interaktion kompetitiver Art. Beobachtet man bei höheren Allosterkonzentrationen ein Abflachen der Linie, liegt ein allosterischer Mechanismus vor. Im Falle der durchgeführten Screening-Experimente wurde nur jeweils eine Alloster-Konzentration eingesetzt. Unter der Annahme einer stark negativen Kooperativität des Allosters mit Acetylcholin würde man einen pseudo-kompetitiven Mechanismus und somit eine Kurve in der Anmutung einer Geraden mit der Steigung 1 erhalten. Legt man durch den ermittelten Punkt also eine Gerade mit der Steigung 1, lässt sich mittels des Schnittpunkts der Geraden mit der X-Achse die Affinität des Allosters zum unbesetzten Rezeptor  $\log K_B$  bestimmen. Stimmt dieser Wert mit den aus heterologen Interaktionsexperimenten mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  bestimmten  $\log K_A$ -Werten überein, kann man die negative Kooperativität der Substanz als erwiesen ansehen.

### 2.3.4.2 Versuchsdurchführung

Die heterologen Konkurrenzexperimente mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  und Acetylcholin wurden mit CHO-Zellmembranen aller fünf muskarinischen Subtypen an einem Harvester 96<sup>®</sup> durchgeführt. Es wurde folgendes Pipettierschema für die 96-well-Platten verwendet:

Reihenfolge der Zugabe	Zugefügtes Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Art der zugefügten Lösung
1.	10	Aqua dest. (Gesamtbdg.) bzw. wässrige Atropinlösung $3 \times 10^{-5}$ M (unspez. Bdg. bzw. ACh-Verdünnungsreihe in Wasser)
2.	10	Alloster-Verdünnung bzw. Aqua dest. (Kontrolle)
3.	20	Wässrige $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Lösung
	250	Mg, Tris, Cl, $\text{P}_i$ -Puffer (L1)
	30	Homogenat ( $\text{M}_1$ - $\text{M}_5$ ) in HEPES-Lagerungspuffer (L8)

**Tab. 5** Pipettierschema für den Ansatz der heterologen Konkurrenzversuche mit Acetylcholin mit Membransuspensionen aus CHO- $\text{M}_1$ - bis  $\text{M}_5$ -Zellen.

Die unter 1. und 2. angegebenen Lösungen wurden in die Mikrotiterplatte vorgegeben. Ein Vielfaches der unter 3. angegebenen Lösungen wurde vor der Zugabe vereinigt, gemischt und anschließend wurden mittels einer Multipipette (G22) jeweils 300  $\mu\text{l}$  in die Bohrungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Das Homogenat wurde



hierzu frisch aufgetaut und mit Aqua dest. auf das benötigte Volumen verdünnt. Die eingesetzte Konzentration an [ $^3\text{H}$ ]NMS betrug 0,4 nM. Zur Inkubation wurden die Mikrotiterplatten mit Parafilm bedeckt und für die berechnete Inkubationszeit im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Filtration und weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte gemäß 2.3.2.2. Die Auswertung der Daten erfolgte wie unter 2.3.4.1 angegeben.

## 2.3.5 Kinetische Experimente

### 2.3.5.1 Theoretische Grundlagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in kinetischen Experimenten die Bindung eines orthosterischen Radioliganden als Funktion der Zeit betrachtet. Im Gleichgewicht findet eine ständige Assoziation und Dissoziation zwischen Liganden und Rezeptor statt. Beides kann durch einen allosterischen Modulator beeinflusst werden. Eine Beeinflussung der Assoziationsgeschwindigkeit ist allerdings ebenfalls durch einen kompetitiven Antagonisten möglich, eine Veränderung der Dissoziationsgeschwindigkeit jedoch ist charakteristisch für einen allosterischen Modulator [61]. Da bei der Beeinflussung der Dissoziationsgeschwindigkeit die orthosterische Bindungsstelle mit dem Radioliganden besetzt ist, muss der allosterische Modulator zwangsläufig ein anderes Haftareal am Rezeptor benutzen.

Aus den kinetischen Experimenten wird der  $\text{EC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert gewonnen. Er stellt den Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Konzentrations-Effekt-Kurve dar, die man durch nichtlineare Regressionsanalyse der Daten erhält. Der  $\text{EC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert ist die Konzentration des Allostere, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden führt, und somit ein Maß für die Affinität des Allostere zu Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle durch den Radioliganden besetzt ist [44].

Im Gleichgewicht laufen Assoziations- und Dissoziationsprozesse parallel ab, was durch folgende Gleichung beschrieben werden kann:

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = k_{+1} \cdot [\text{R}] \cdot [\text{L}] - k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad \text{Gleichung 14}$$

Im Dissoziationsexperiment wird durch Zugabe eines kompetitiven Antagonisten im Überschuss die Re-Assoziation des Radioliganden unterbunden und somit der Dissoziationsprozeß sichtbar gemacht. Dieser Zerfall von Rezeptor-Ligand-Komplexen folgt einer monoexponentialen Funktion:

$$[RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{-k_{-1}t} + u \quad \text{Gleichung 15}$$

$[RL]_t$ : Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt  $t$

$[RL]_0$ : Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt  $t = 0$ , unmittelbar vor dem Start der Dissoziationsmessung

$u$ : unspezifische Radioligandbindung

Mit Kenntnis der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  lässt sich die Dissoziationshalbwertszeit  $t_{1/2}$  errechnen:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad \text{Gleichung 16}$$

Die Dissoziationshalbwertszeit beschreibt den Zeitraum, indem die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe um die Hälfte reduziert wird. Die Dissoziationshalbwertszeit und damit auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  wird in Gegenwart eines allosterischen Modulators konzentrationsabhängig beeinflusst. Wird sie in Gegenwart einer bestimmten Konzentration eines allosterischen Modulators ermittelt, bezeichnet man  $k_{-1}$  auch als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante. Zur Auswertung der Daten werden die apparenten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten in Prozent des Kontrollwerts in Abwesenheit von allosterischer Testsubstanz halblogarithmisch gegen die Konzentration des untersuchten allosterischen Modulators aufgetragen. Mittels computergestützter nichtlinearer Regressionsanalyse anhand Gleichung 4 erhält man eine sigmoidal verlaufende Konzentrations-Effekt-Kurve, deren Wendepunkt dem  $EC_{0,5diss}$  entspricht. Unterscheidet sich das untere Plateau der Kurve signifikant von 0%, ist der allosterische Modulator selbst in hohen Konzentrationen nicht in der Lage die Dissoziation des Radioliganden komplett zu unterbinden. Ein signifikant von  $-1$  abweichendes Steigungsmass  $n$  könnte auf ein

komplexeres Bindungsverhalten des allosterischen Modulators mit dem Rezeptor hindeuten und als auf eine einfache 1:1-Interaktion.

Zur Zusammenfassung mehrerer Einzelexperimente wurden die Daten der entsprechenden Allosterkonzentrationen vereinigt und aus der daraus resultierenden Kurve der Affinitätsparameter  $pEC_{0,5diss}$  entnommen.

### Zweipunkt-Dissoziationsexperimente

Neben Versuchen, bei denen der Dissoziationsverlauf des Radioliganden vom Rezeptor durch mehrmalige Probennahme genau beschrieben wird, wurden auch sog. Zweipunkt-Dissoziationsexperimente durchgeführt. Hierbei wird die spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt  $t=0$ , nach einer bestimmten Zeit der Gleichgewichtseinstellung (30 min), jedoch bevor durch Zugabe eines Überschusses eines kompetitiven Antagonisten die Dissoziation sichtbar gemacht wird, bestimmt. Ein zweiter Messpunkt wird zu einem zuvor festgelegten Zeitpunkt  $t$  während des Dissoziationsverlaufs bestimmt. Die Zeitspanne, für welche die Dissoziation gemessen wird, sollte in etwa das 1,5-fache der Dissoziationshalbwertszeit unter Kontrollbedingungen betragen. Somit ermittelt man zum Zeitpunkt  $t$  unter Kontrollbedingungen eine Radioligandbindung die zwischen 25 und 50% des Ausgangswertes liegt. Diese Methode wurde von Kostenis und Mohr [61] im Detail beschrieben. Der Vorteil dieser Methode ist ein geringerer experimenteller Aufwand mit einem damit verbundenen geringeren Aufwand an Versuchsmaterialien und Radioligand, da zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante nur jeweils zwei Messpunkte ausreichend sind. Voraussetzung für die Anwendung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente ist, dass der Zerfall der Ligand-Rezeptor-Komplexe einer monoexponentiellen Funktion (Gleichung 14) folgt. Der Zeitpunkt  $t$  sollte so gewählt werden, dass die Steigung der resultierenden Exponentialfunktion durch die computergestützte Datenanalyse gut bestimmt werden kann. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  wird mittels folgender Gleichung ermittelt:

$$k_{-1} = \frac{\ln\left(\frac{B_{t, \text{spez}}}{B_{0, \text{spez}}}\right)}{t}$$

**Gleichung 17**

$B_{t, \text{spez}}$ : spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt  $t$

$B_{0, \text{spez}}$ : spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt  $t = 0$ , also vor dem Start der Dissoziationsmessung

Aus den ermittelten  $k_{-1}$ -Werten wurden, wie vorher beschrieben, die Konzentrations-Effekt-Kurven erstellt.

### 2.3.5.2 Versuchsdurchführung

#### Kompletter Dissoziationsversuch an Homogenaten aus Schweineherzventrikul-gewebe

Mit Hilfe dieser Versuche konnte die Affinität der untersuchten Substanzen zu muskarinischen  $M_2$ -Rezeptoren, welche mit dem orthosterischen Antagonisten  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  besetzt waren, ermittelt werden. Alle Versuche wurden bei einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad durchgeführt, wobei der Versuchsansatz ständig von einem Magnetrührer durchmischt wurde. Die zugefügte  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Lösung hatte eine Endkonzentration von  $0,2 \text{ nM}$  im Ansatz. Der Versuchsansatz wurde gemäß der folgenden Reihenfolge in einen  $50\text{ml}$ -Erlenmeyerkolben aus Glas pipettiert.

Zugefügtes Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Art der zugefügten Lösung
1600	Wässrige $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Lösung
200	Aqua dest.
16800	Mg, Tris, Cl, $\text{P}_i$ -Puffer (L1)
4000	Homogenat
30 min Inkubationsphase, anschließend Bestimmung der Gesamtbindung (je 3 Proben à $1 \text{ ml}$ )	
1400	„Startlösung“ (bestehend aus $700 \mu\text{l}$ wässriger Atropinlösung ( $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) und $700 \mu\text{l}$ der zu untersuchenden Testsubstanz in Aqua dest.)

**Tab. 6** Pipettierschema für die Ansätze der kompletten Dissoziationsversuche mit Schweineherzhomogenat.

Das aufgetaute Schweineherzhomogenat wurde mit Wasser auf das gewünschte Volumen verdünnt und bis zur Zugabe unter Kühlung mit einem Magnetrührer in

Suspension gehalten. Das Gesamtvolumen je Ansatz betrug 22600  $\mu\text{l}$  und wurde eine halbe Stunde im Wasserbad inkubiert, um eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Radioligand und Rezeptor zu ermöglichen. Nach der Inkubationszeit wurden je Ansatz 3 Proben à 1 ml entnommen, filtriert und gemäß 2.3.2.2 aufgearbeitet. Danach wurden 1,4 ml der „Startlösung“, bestehend aus 700  $\mu\text{l}$  Atropinlösung (Endkonzentration  $10^{-6}$  M) und 700  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Allosterkonzentration, zugegeben und somit die Messung der Dissoziationskinetik gestartet. Im Folgenden wurden zu genau definierten Zeitpunkten über 2 Stunden Proben à 1 ml entnommen und gemäß 2.3.2.2 zur Messung vorbereitet. Die Zeitpunkte der Probennahme wurden zuvor so gewählt, dass sie den Dissoziationsverlauf möglichst gut beschrieben. Die Veränderungen in Volumen und Konzentration gegenüber den später entnommenen Proben, die durch Entnahme der Proben für die Gesamtbindung und die Zugabe der Startlösung entstanden, wurden bei der Auswertung der Daten durch eine Multiplikation der Werte für die Gesamtbindung mit dem Faktor 0,94 berücksichtigt. Die Auswertung der Konzentrations-Effekt-Kurven erfolgte gemäß 2.3.4.1.

### **Kompletter Dissoziationsversuch an Homogenaten aus CHO-Zellen**

Die Dissoziationsversuche mit Membransuspensionen aus CHO-Zellen wurden wie auch schon die Versuche unter Gleichgewichtsbedingungen mit einem Harvester 96<sup>®</sup> abfiltriert. Da hier nicht zu jedem beliebigen Zeitpunkt während eines Dissoziationsverlaufs eine Filtration stattfinden kann, sondern die Filtration am Ende des Versuches nur einmalig stattfindet, ist hier ein anderer Ansatz, sowohl im Volumen der zugefügten Lösungen als auch in der zeitlichen Abfolge, notwendig.

Da in den verwendeten CHO-Zell-Linien die Gene der humanen muskarinischen Rezeptorsubtypen  $M_1$  bis  $M_5$  stabil transfiziert vorlagen, konnte mit Hilfe der Membranen die Affinität zum [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor ausgewählter allosterischer Modulatoren für alle fünf Rezeptorsubtypen bestimmt werden. In die Bohrungen der verwendeten 96-well-Mikrotiterplatten (V1) wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  einer Startlösung, die aus 10  $\mu\text{l}$  wässriger Atropinlösung ( $10^{-6}$  M im Ansatz) und entweder 10  $\mu\text{l}$  Aqua dest. als Kontrolle bzw. 10  $\mu\text{l}$  einer Alloster-Verdünnung in Wasser, vorgelegt. Daneben wurde eine Rezeptor-Radioligand-Suspension mit folgenden Lösungen angefertigt:

1. 20 µl wässrige [<sup>3</sup>H]NMS-Lösung (0,4 nM Endkonzentration)
2. 240 µl Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer (L1)
3. 30 µl Homogenat

Das Homogenat wurde frisch aufgetaut und mit Wasser auf das gewünschte Volumen verdünnt. Ein Vielfaches der oben beschriebenen Rezeptor-Radioligand-Suspension wurde zu Versuchsbeginn zusammengegeben und im Wasserbad bei 37°C 30-240 min, je nach Kinetik der Rezeptorsubtypen, zum Erreichen eines Reaktionsgleichgewichts inkubiert. Zu vorher festgelegten Zeitpunkten wurden jeweils 300 µl dieser Rezeptor-Radioligand-Suspension in die vorbereiteten Bohrungen der Mikrotiterplatte gegeben. Für jede Alloster-Konzentration sowie für die Kontrollwerte erfolgte eine doppelte Bestimmung. Zwischen den Zugabezeitpunkten wurden sowohl die Rezeptor-Radioligand-Suspension, als auch die mit Parafilm abgedichtete 96-well-Mikrotiterplatte, im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Für jede Alloster-Konzentration und jeden Rezeptorsubtyp wurde der Dissoziationsverlauf anhand von acht Messpunkten bestimmt, die abhängig von der Kinetik des Rezeptorsubtyps auf ca. 120 Minuten verteilt wurden. Am Ende des Versuchs wurden alle Proben gleichzeitig wie unter 2.3.2.2 beschrieben abfiltriert und für der Messung zugänglich gemacht. Die Auswertung erfolgte gemäß 2.3.5.1.

Wie auch schon bei den Versuchen unter Gleichgewichtsbedingungen tritt auch hier eine vernachlässigbare Abweichung der Verdünnungsfaktoren von 32 statt 30 für die Alloster-Verdünnungen auf.

### **Zweipunkt-Dissoziationsversuch an Homogenaten aus Schweineherzventrikelgewebe**

Ein Großteil der Testsubstanzen wurde mit Hilfe der Zweipunkt-Dissoziationsversuche untersucht, da man so mit wenig Materialaufwand und in kurzer Zeit zu einer Großzahl an Meßergebnissen kommt. Die Ansätze wurden jeweils in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorbereitet. Die eingesetzte Radioligandkonzentration im Ansatz betrug 0,2 nM. Die Inkubation fand in einem Schüttelwasserbad bei 37°C statt. Die Tabellen 6 und 7 führen die Zusammensetzung sowie die Zugabereihenfolge der verschiedenen Ansätze auf:

Zugefügtes Volumen [ $\mu$ l]	Art der zugefügten Lösung
100	Wässrige [ $^3$ H]NMS-Lösung
50	Aqua dest. (Gesamtbindung) bzw. wässrige Atropinlösung $3 \times 10^{-5}$ M (unspez. Bdg.)
1100	Mg, Tris, Cl, $P_i$ -Puffer (L1)
250	Homogenat

**Tab. 7** Pipettierschema für die Ansätze für Zweipunkt-Dissoziationsversuche mit Schweineherzhomogenat für Gesamtbindung und unspezifische Bindung

Zugefügtes Volumen [ $\mu$ l]	Art der zugefügten Lösung
100	Wässrige [ $^3$ H]NMS-Lösung
1150	Mg, Tris, Cl, $P_i$ -Puffer (L1)
250	Homogenat

**Tab. 8** Pipettierschema für die Ansätze für Zweipunkt-Dissoziationsversuche mit Schweineherzhomogenat in Anwesenheit von allosterischem Modulator sowie für den Kontrollansatz

Die Reaktionsansätze wurden jeweils dreifach bestimmt. Das Homogenat wurde frisch aufgetaut, mit Wasser entsprechend verdünnt und mit einem Magnetrührer bis zur Zugabe in Suspension gehalten. Als letztes wurde den Ansätzen das Homogenat zugefügt und damit die Inkubationszeit gestartet. Nach kurzem Schütteln der Reaktionsgefäße wurden sie im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde von den Ansätzen für die Gesamt- und unspezifische Bindung jeweils 1 ml abfiltriert, laut 2.3.2.2 aufgearbeitet und somit die Werte der Dissoziationskurven für  $t = 0$  bestimmt. Den anderen Ansätzen wurde nach 30-minütiger Inkubation 100  $\mu$ l „Startlösung“, bestehend aus 50  $\mu$ l wässriger Atropinlösung und 50  $\mu$ l Allosterverdünnung bzw. 50  $\mu$ l Aqua dest. für die Kontrolle, zum Starten der Dissoziationsreaktion zugegeben. Nach genau 10 Minuten weiterer Inkubation im Wasserbad wurde die Dissoziation durch Abfiltration gestoppt. Hierzu wurde den Ansätzen je 1 ml entnommen und wie unter 2.3.2.2 weiter verfahren. Der Unterschied in Volumen und Verdünnung der Lösungen zwischen Gesamtbindung und den Proben in Anwesenheit eines allosterischen Modulators, der sich durch Zugabe der Startlösung ergibt, wurde ausgeglichen, indem die Daten der Gesamtbindung vor der Auswertung mit dem Faktor 0,94 multipliziert wurden.

### Zweipunkt-Dissoziationsversuch an Homogenaten aus CHO-Zellen

Für die Zweipunkt-Dissoziationsversuche mit Homogenaten aus CHO-Zellen wurde mit einem Harvester 96<sup>®</sup> gearbeitet und die Versuche hierzu in 96-well-Mikrotiterplatten angesetzt. Die Konzentration von [<sup>3</sup>H]NMS im Ansatz betrug 0,4 nM. Die Atropin-Lösung wurde mit einer Endkonzentration von 10<sup>-6</sup> nM im Ansatz eingesetzt. Pro Versuch wurde jeweils eine Doppelbestimmung der Werte vorgenommen. In die Bohrungen der Mikrotiterplatten wurden folgende Lösungen vorgelegt:

Gesamtbindung:	20 µl Aqua dest. + 20 µl [ <sup>3</sup> H]NMS-Lösung
Unspez. Bindung:	10 µl Aqua dest. + 10 µl Atropin-Lösung + 20 µl [ <sup>3</sup> H]NMS-Lösung
Kontrolle:	10 µl Aqua dest. + 10 µl Atropin-Lösung
Alloster:	10 µl Allosterverdünnung + 10 µl Atropin-Lösung

Daneben wurde in einem 50 ml-Erlenmeyerkolben ein Vielfaches einer Mischung, bestehend aus 250 µl Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer (L1) und 30 µl Homogenatverdünnung, hergestellt. Das Homogenat wurde hierzu frisch aufgetaut und mit Aqua dest. auf das gewünschte Volumen verdünnt. 30 Minuten vor dem Zeitpunkt der Filtration wurden zur Bestimmung der Gesamt- und unspezifischen Bindung 280 µl dieses Puffer-Homogenat-Gemisches in die dafür vorgesehenen Bohrungen zugegeben, die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm abgedichtet und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Der Ansatz für die Zweipunkt-Dissoziationsversuche in Anwesenheit eines allosterischen Modulators sah wie folgt aus:

Zugefügtes Volumen [µl]	Art der zugefügten Lösung
20	Wässrige [ <sup>3</sup> H]NMS-Lösung
250	Mg, Tris, Cl, P <sub>i</sub> -Puffer (L1)
30	Homogenat

**Tab. 9** Pipettierschema für die Ansätze für Zweipunkt-Dissoziationsversuche mit Homogenat aus CHO-Zellen in Anwesenheit von allosterischem Modulator sowie für den Kontrollansatz

Ein Vielfaches der Mischung von Puffer und Homogenat wurde hierzu wieder der vorher angefertigten Mischung entnommen, 30 Minuten vor Zugabe zur

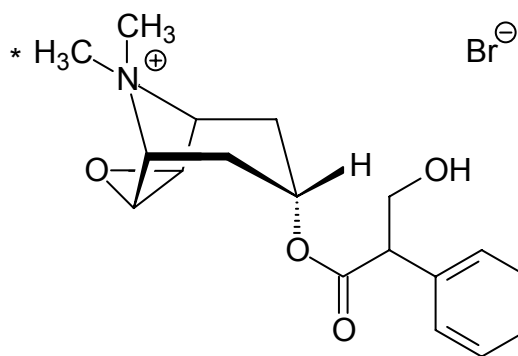


Mikrotiterplatte in einem Vial (V2) mit der Radioligandlösung durchmischt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Eine jeweils für die Kinetik des entsprechenden Rezeptorsubtyp spezifische Zeitspanne  $t$  ( $M_1 = 25$  min,  $M_2 = 5$  min,  $M_3 = 35$  min,  $M_4 = 33$  min,  $M_5 = 50$  min) vor dem Zeitpunkt der Filtration wurden 300  $\mu$ l dieses Ansatzes in die vorgesehen Bohrungen gegeben und nach Abdeckung der Mikrotiterplatte mit Parafilm bis zur Filtration bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Zeitspanne  $t$  berechnete sich bei allen Rezeptorsubtypen aus dem ca. 1,5-fachen der Kontrollhalbwertszeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation des entsprechenden Rezeptorsubtyps. Die Filtration und Aufbereitung des Filters erfolgte gemäß 2.3.2.2. Die Auswertung der Daten erfolgte nach 2.3.4.1. Bei den Versuchen mit CHO-Zellhomogenaten unterlagen die Verdünnungsreihen wie schon bei 2.3.2.2 und 2.3.3.2 beschrieben einen Verdünnungsfaktor 32 statt 30, was vernachlässigt werden kann.

## 2.4 Materialien

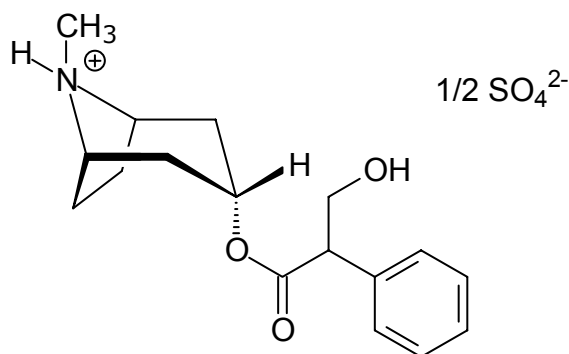
### 2.4.1 Orthosterische Liganden

In Radioligandbindungsuntersuchungen wurde der tritiierte muskarinische Antagonist N-Methylscopolamin (NMS, Abb. 2) zur Besetzung der orthosterischen Bindungsstelle eingesetzt. Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Membranhomogenate wurden zusätzlich verschiedene Verdünnungen der nicht radioaktiv markierten Substanz eingesetzt.



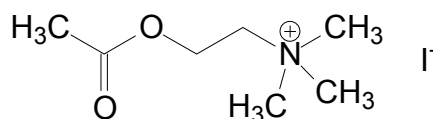
**Abb. 2** Strukturformel des orthosterischen Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{N}$ -Methylscopolaminbromid.  
\* Position der radioaktiven Markierung.

Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung sowie zum Verhindern der Reassoziaton des Radioliganden in kinetischen Experimenten wurde ein Überschuss des muskarinischen Antagonisten Atropin (Abb. 3) eingesetzt.



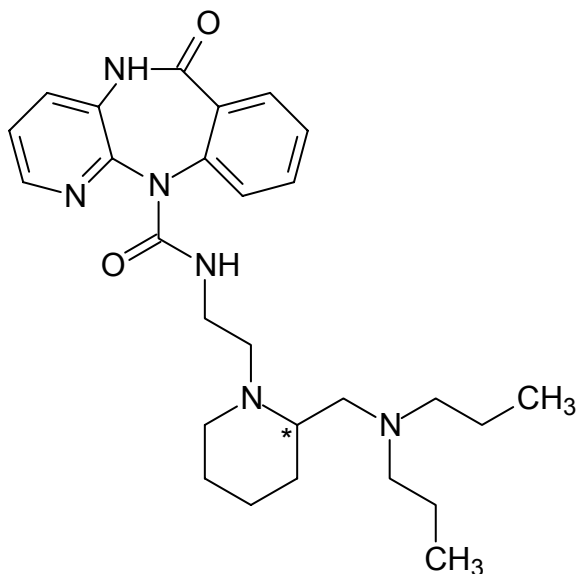
**Abb. 3** Strukturformel des orthosterischen Liganden Atropinsulfat

In heterologen Interaktionsexperimenten mit und ohne allosterischem Modulator wurde der Effekt von Naphmethonium auf die Agonistbindung untersucht. Als Agonist diente der endogene Überträgerstoff Acetylcholin (Abb. 4).



**Abb. 4** Strukturformel des orthosterischen Agonisten Acetylcholin

Die Verbindung AF-DX384 (Abb. 5), die einen der ersten orthosterischen muskarinischen Antagonisten mit ausgeprägter Subtypselektivität darstellt, wurde in heterologen Interaktionsexperimenten untersucht. Eingesetzt wurde hierbei das Racemat.



**Abb. 5** Strukturformel von AF-DX 384

#### 2.4.2 Allosterische Modulatoren

Die Leitstruktur W84 der in dieser Arbeit verwendeten allosterischen Modulatoren wurde von Herrn Dr. Pfeffer (Pharmakologisches Institut der Universität Kiel) nach der Methode von Wassermann (1970) synthetisiert.

Alle weiteren Verbindungen wurden in den Arbeitskreisen von Frau Prof. Dr. U. Holzgrave (Pharmazeutisches Institut der Universität Würzburg) sowie von Herrn Prof. Dr. R. Tacke (Si-haltige Verbindungen; Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg) synthetisiert und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

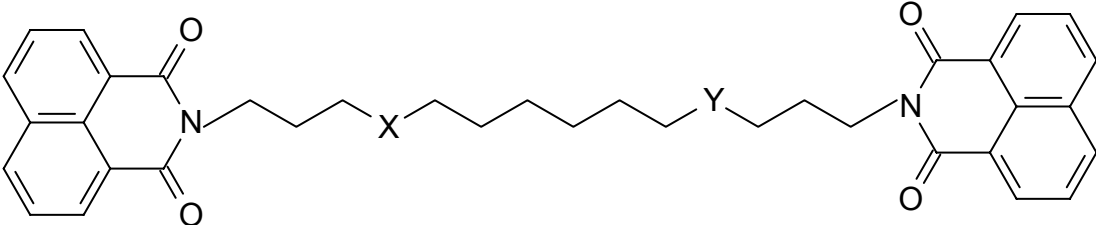
	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>3</sup>	Y <sup>1</sup>	Y <sup>2</sup>
W84	H	H	H	H	H
MM5A*	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
OS30	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
MM4A*	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
MM4F	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
MM4G	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
MM4H	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
WB41	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H
MM5B*	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
OS72	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
MM4E*	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

**Tab. 10** Strukturformeln der untersuchten W84-Derivate

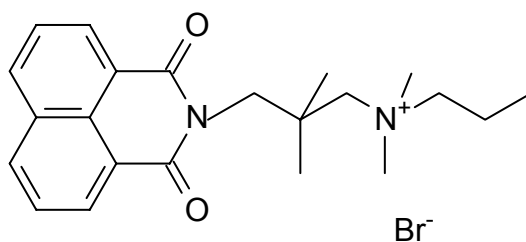
\* Substanz liegt als Racemat vor

	Y <sup>1</sup>	Y <sup>2</sup>	X
WB37	H	H	H
Naphmethonium	H	H	CH <sub>3</sub>
MM3J	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>
MM3L	NO <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>
MM3M	H	NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>

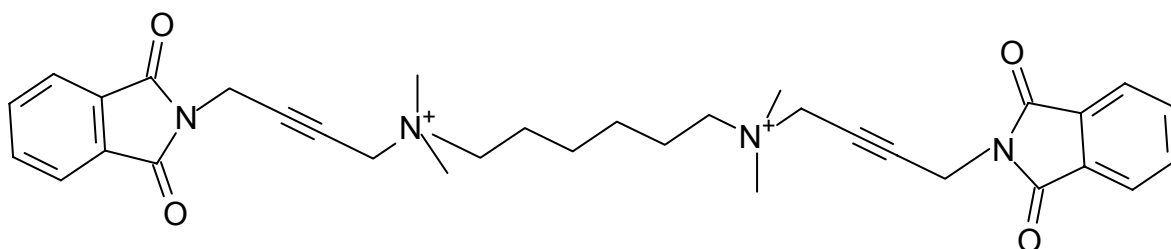
**Tab. 11** Naphmethonium und Derivate

		
	X	Y
TDH <sub>2</sub>	N <sup>+</sup> H <sub>2</sub>	Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
TDF	N <sup>+</sup> HCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
WB64	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
MM8A	N <sup>+</sup> HCH <sub>3</sub>	N <sup>+</sup> HCH <sub>3</sub>

**Tab. 12** Silizium-haltige W84-Derivate und Alkan-bis-ammonium-Verbindungen mit unterschiedlichem N-Substitutionsmuster. TDF enthält darüber hinaus einen Fluorhaltigen Substituenten mit möglicher Eignung zu Positronen-Emissions-Tomographie (PET).



**Abb. 6** Strukturformel eines verkürzten Naphmethonium-Derivats (MM7A)



**Abb. 7** Strukturformel eines W84-Derivats mit Dreifachbindungen in den Seitenketten (RP25)

### 2.4.3 Lösungen

#### L1 Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer

Dieser Puffer wurde in allen Bindungsexperimenten verwendet. Hierzu wurde je nach Versuchsansatz die entsprechende Menge  $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) abgewogen, um im Endansatz eine Konzentration von 3 mM  $\text{MgHPO}_4$  und 50 mM Tris zu haben. Die abgewogene Menge  $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  wurde unter Zusatz von 1 N HCl in Aqua dest. gelöst. Danach wurde die entsprechende Menge Tris in Lösung gebracht und die klare Lösung mittels 1 N-HCl auf einen pH von 7,3 eingestellt.

#### L2 G418-Lösung

Als Zugabe zum Nährmedium von stabil transfizierten CHO-Zellen ist in der Stammlösung eine Geneticin-„Wirkstärke“ von 100 mg/ml erforderlich. Die „Wirkstärke“ ist abhängig von der Charge und wird in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  geliefertes Pulver angegeben. Es wurde eine genaue Einwaage in ein 50 ml PP-Röhrchen vorgenommen und die entsprechende Menge Wasser zugegeben. Die erhaltene klare Genitacin-Lösung wurde unter der Arbeitsbank in ein anderes 50 ml PP-Röhrchen sterilfiltriert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 1 ml aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### L3 Nährmedium

Zum handelsüblichen Nährmedium F-12 (Nutrient Mixture F-12 Ham) wurde zugegeben:

Fetales Kälber Serum	50 ml
Penicillin-Streptomycin Lösung	5 ml
L-Glutamin Lösung (200mM)	3 ml
G418 Stammlösung (100mg/ml)	1 ml

#### L4 Phosphatpuffer (PBS, Phosphate buffered saline)

9,6 g des gebrauchsfertigen Pulvers wurden in 1 Liter Aqua dest. gelöst und anschließend bei  $121^\circ\text{C}$  für 20 Minuten autoklaviert.

**L5 Butyrat-Lösung (100mM)**

1,10 g Butyrat  
ad 100 ml Aqua dest.

18 Stunden vor einer Membranpräparation wurden 15,5ml Butyratlösung auf 310ml Nährmedium gegeben, um die Expression der Muskarinrezeptoren in den CHO-Zellen zu steigern.

**HEPES-Puffer**

L6 Stammlösung (200 nM): 17,353g HEPES Na-Salz  
31,773g HEPES Säure  
ad 1000 ml Aqua dest.

Die Stammlösung wurde mit 0,1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

L7 Puffer 1 (Präparationspuffer): 50 ml HEPES-Stammlösung  
(20 mM HEPES, 10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA) + 50 ml Na<sub>2</sub>-EDTA (100 mM)  
ad 500ml Aqua dest.

L8 Puffer 2 (Lagerungspuffer): 50 ml HEPES-Stammlösung  
(20 mM HEPES; 0,1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA) + 0,5 ml Na<sub>2</sub>-EDTA (100 mM)  
ad 500ml Aqua dest.

**2.4.4 Reagenzien**

	Produktnummer
<b>Acros Organics (Geel, Belgien)</b>	
R1 Natriumbutyrat (MG: 110,1 g/mol)	26319
R2 Natriumchlorid (NaCl; MG: 58,4 g/mol)	207790010
<b>Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)</b>	
R3 Ready Protein+™	586604
<b>Fluka Biochemika (Buchs, Schweiz)</b>	

R4 Magnesium-Hydrogenphosphat Trihydrat ( $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ;  
MG: 174,3 g/mol) 63080

**Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)**

R5 EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Dinatrium-Salz  
( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; Maßlösung 0,1 mol/l) 20271

R6 Salzsäure (1 mol/l) 23204

**Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)**

R7 Folin-Ciocalteus Phenolreagenz 1.09001.0500

R8 Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (MG: 249,7 g/mol) 1.02790.0250

R9 Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; MG 106,0 g/mol) 1.06392.0500

R10 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris; MG: 121,1 g/mol) 1.08382.0500

**Merck Biosciences GmbH (Schwalbach, Deutschland)**

R11 G418-Sulfat (MG: 692,7 g/mol) 345810

**Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland)**

R12 Natronlauge (0,1 mol/l) 35263

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)**

R13 Dimethylsulfoxid (DMSO; MG: 78,1 g/mol) D-5879

R14 Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)  
(9,6 g Pulver zur Herstellung von 1 l Lösung) D-5652

R15 Fetales Rinderserum F-7524

R16 HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethan-  
sulfonsäure]), Natriumsalz (MG: 260,3 g/mol) H-7006

R17 HEPES, freie Säure (MG: 238,3 g/mol) H-3375

R18 Humanes Serumalbumin, Fraktion V, 96-99% Albumin A-1653

R19 L-Glutamin-Lösung 200 mM G-7513



---

R20	Nutrient Mixture F-12 Ham	N-4888
R21	Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin : 10.000 U/ml; Streptomycin : 10 mg/ml)	P-0781
R22	Polyethylenimin-Lösung (PEI) 50% (g/ml), wässrige Lösung	P-3143
R23	Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l Na <sub>4</sub> EDTA)	T-3924

#### 2.4.5 Verbrauchsmaterialien

##### Abgene House (Epsom, UK)

V1	1,2 ml Storage Plate (96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen)	AB-0564
----	--	---------

##### Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

V2	Szintillationsgefäß aus PE, 21 ml	5810100
----	-----------------------------------	---------

##### Greiner Bio-One GmbH (Solingen, Deutschland)

V3	Cellstar® Zellkulturschale (mit Nocken, 145 x 20 mm, steril)	639160
V4	Einfrierröhrchen (Cryovials; 1 ml)	123263
V5	Polypropylen (PP)-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	616201
V6	Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (50 ml, steril)	227261

##### Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH (Bruchsal, Deutschland)

V7	Qualilab® Spitzenvorsatzfilter (0,22 µm CM-Membran; steril)	5122110
----	---	---------

##### Nalge Nunc International (Rochester, USA)

V8	Oak Ridge Centrifuge Tubes with Sealing Cap (Polycarbonat(PC)-Zentrifugenröhrchen)	3138-0050
----	---	-----------

##### Pechiney Plastic Packaging (Menasha, USA)

V9	Parafilm® M laboratory film	PM-996
----	-----------------------------	--------

**PerkinElmer Life Sciences GmbH (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)**

V10	Meltilex™ A	1450-441
V11	Printed Filtermat A	1450-421
V12	Sample Bag	1450-432
V13	Plate Cassette	1450-105

**Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)**

V14	Zellschaber (2-Positionen-Klinge; 25 cm)	83.1830
-----	--	---------

**Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)**

V15	Glasfaserrundfilter GF6	10370018
-----	-------------------------	----------

**2.4.6 Geräte****Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, USA)**

G1	Beckman Counter LS-6000 SC
G2	Ultrazentrifuge Avanti™ J-20 XP, Rotortypen: JS 4.3 bzw. JA 25.50
G3	Ultrazentrifuge L7-35

**Biochrom, Ltd. (Cambridge, UK)**

G4	Ultrospec 3300 pro
----	--------------------

**Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, Deutschland)**

G5	Mikroskop Axiovert 25
----	-----------------------

**Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)**

G6	GFL 1083 Schüttelwasserbad
----	----------------------------

**Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland)**

G7	Präzisionsküvetten 100-QS
----	---------------------------

**Heraeus (Hilden, Deutschland)**

G8	Herasafe Werkbank HS 15, Klasse II
----	------------------------------------

**IKA® Works, Inc. (Wilmington, USA)**

G9 MS 1 Minishaker (Kleinschüttler)

**Janke & Kunkel, IKA® Labortechnik (Staufen, Deutschland)**

G10 Potter Elvehjem Glashomogenisator

**Kinematica AG (Littau, Schweiz)**

G11 PCU 8S/EUD Drehzahlregler

G12 Polytron-Homogenisator PT 10-35

**Mettler-Toledo AG (Greifensee, Schweiz)**

G13 Analysenwaage AG204

G14 Präzisionswaage PB403-S

**Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland)**

G15 Elix® Wasseraufbereitungssystem  
(zur Herstellung von Aqua destillata)

G16 Milli-Q® Reinstwassersystem  
(zur Herstellung von Aqua pro analysi)

**PerkinElmer Life Sciences GmbH (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)**

G17 1450 Microbeta® Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter

G18 Harvester 96® (Mach II M, Tomtec)

**Sharp Electronics GmbH (Hamburg, Deutschland)**

G19 Mikrowelle R-611

**Techne (Duxford, Cambridge, UK)**

G20 Dri-Block® DB-2A

**Thermo Labsystems Oy (Helsinki, Finnland)**

G21 Finnpipette Digital (verschiedene Größen)

G22 Finnpipette Stepper

**ThermoForma Scientific (Marietta, USA)**G23 ThermoForma Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator**Waring (New Hartford, USA)**

G24 Waring Blendor-Homogenisator

**2.4.7 Computerprogramme***GraphPad Prism*® Version 3.02 und 4.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)*GraphPad Instat*® Version 3.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)

ChemWindow® Version 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, USA)

*Microsoft*® *Word* Version 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)*Microsoft*® *Excel* Version 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)**2.5 Statistik**

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten statistischen Parameter sollen im Folgenden kurz erklärt werden.

Die Berechnung des arithmetischen Mittels erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

**Gleichung 18**

Die Standardabweichung SD als Maß der Streuung der Messwerte um den Mittelwert berechnet sich aus der Quadratwurzel der Varianz  $s^2$ :

$$SD = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

**Gleichung 19**

Der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) steht mit der Standardabweichung in folgender Beziehung:

$$\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 20}$$

Mittels F-Test wird überprüft, ob die Varianzen zweier Stichproben oder zweier analytischer Verfahren identisch sind oder sich signifikant unterscheiden. In dieser Arbeit werden beispielsweise Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die sich bezüglich einer zusätzlichen Variablen (z.B. Steigung  $n$ ) unterscheiden, im Hinblick auf die jeweiligen Fehlerquadrate mittels F-Test verglichen.

$$F = \frac{\frac{ss_a - ss_b}{df_a - df_b}}{\frac{ss_b}{df_b}} \quad \text{Gleichung 21}$$

- $ss_a$ : Summe der Fehlerquadrate unter Einsatz der einfacheren Gleichung a
- $ss_b$ : Summe der Fehlerquadrate unter Einsatz der komplexeren Gleichung b (zusätzliche Variable)
- $df_a$ : Anzahl der Freiheitsgrade von Gleichung a
- $df_b$ : Anzahl der Freiheitsgrade von Gleichung b

Liegt der errechnete F-Wert oberhalb eines tabellierten Wertes, so ist die Kurvenanpassung mit der komplexeren Gleichung (zusätzliche Variable) signifikant besser. Die Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit auf 5% ( $p < 0,05$ ) festgesetzt.

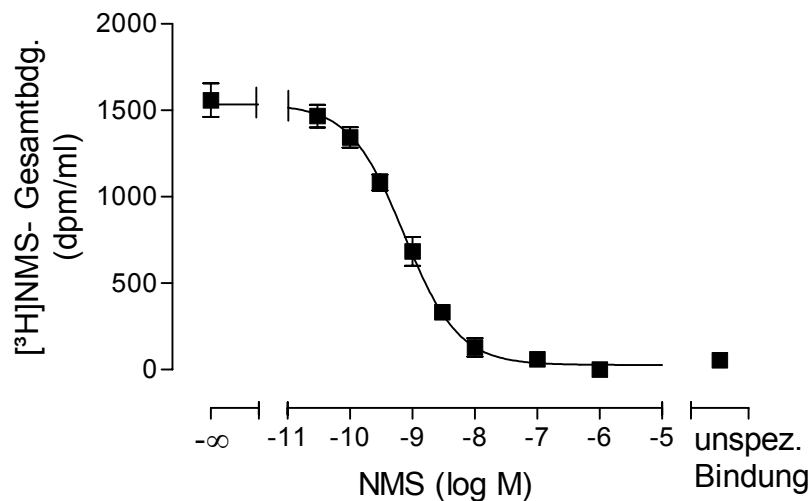
Der Vergleich von Mittelwerten unterschiedlicher Datensätze wurde unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Instat<sup>®</sup> durchgeführt. Voraussetzung hierfür waren nicht signifikant unterschiedliche Standardabweichungen der zu vergleichenden Mittelwerte und eine

Normalverteilung der Daten nach Gauss. Bei signifikant unterschiedlichen Standardabweichungen wurde die Welch-Korrektur angewandt.

### 3 Ergebnisse

#### ***3.1 Charakterisierung der verwendeten Membransuspensionen***

Die Bindungseigenschaften der in dieser Arbeit eingesetzten Membranhomogenate aus Schweineherzventrikelgewebe und CHO-Zellen (M<sub>1</sub> bis M<sub>5</sub>) wurden mittels homologer Konkurrenzexperimente (2.3.2) charakterisiert. Mit Hilfe dieser Experimente konnten die Parameter  $K_D$  (Gleichgewichtsdissoziationskonstante) als Maß für die Affinität des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS und  $B_{max}$ , die Gesamtzahl der Bindungsstellen für [<sup>3</sup>H]NMS, ermittelt werden. Die Durchführung der Versuche sowie die Auswertung der resultierenden Bindungsdaten erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die resultierende Kurve eines homologen Konkurrenzexperiments mit einer Membransuspension aus Schweineherzventrikelgewebe.



**Abb. 8** Repräsentatives Experiment einer homologen Konkurrenz mit steigenden Konzentrationen NMS in Anwesenheit einer fixen Konzentration des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS (0,2 nM). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler einer Dreifachbestimmung. Der Versuch wurde durchgeführt in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer bei 37°C mit einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Ordinate: [<sup>3</sup>H]NMS-Gesamtbindung (dpm/ml), Abszisse: NMS-Konzentration (log M). Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Die dargestellte Kurve hat ein unteres Plateau von  $27 \pm 31$  dpm/ml, das nicht signifikant von der unspezifischen Bindung abweicht ( $54 \pm 6$  dpm/ml, ermittelt in Gegenwart von 1  $\mu$ M Atropin). Die Steigung der Kurve ist nicht signifikant verschieden von  $n = -1$  ab (F-Test,  $p > 0,05$ ) und konnte daher auf diesen Wert festgesetzt werden. Mit dem hieraus ermittelten IC<sub>50</sub>-Wert von 0,74 nM kann nach Cheng und Prusoff [54] der  $K_D = 0,54$  nM berechnet werden. Unter Berücksichtigung des Proteingehalts der Membransuspension (3,34 mg/ml, Bestimmung nach Lowry s. 2.2) und der Verdünnung der Membransuspension im Ansatz berechnet sich der B<sub>max</sub>-Wert nach DeBlasi [55] zu 114 fmol/mg<sub>Protein</sub>.

Die unspezifische Bindung betrug bei Untersuchungen mit Homogenaten aus Schweineherzventrikelgewebe durchschnittlich  $8 \% \pm 1$  der Gesamtbindung. Bei Experimenten mit Membranen aus CHO-Zellen wurde eine durchschnittliche unspezifische Bindung von  $3 \% \pm 0,4$  der Gesamtbindung gemessen (kein signifikanter Unterschied zwischen den Subtypen).

Die folgenden Tabellen zeigen eine Übersicht aller in dieser Arbeit eingesetzten Membranhomogenate mit den charakterisierten Parametern.



Homogenat (Tag der Herstellung)	$pK_D$	$B_{max}$ (fmol/mg <sub>Protein</sub> )	Proteingehalt (mg/ml)	$k_{-1}$	$t_{1/2, diss}$ (min)
18.02.03	9,41 ± 0,13 n = 3	86 ± 7 n = 3	5,09 ± 0,45 n = 3	0,26 ± 0,01 n = 32	2,75 ± 0,07 n = 32
14.10.03	9,33 ± 0,01 n = 3	116 ± 1 n = 3	3,34 ± 0,12 n = 3	0,25 ± 0,01 n = 26	2,77 ± 0,06 n = 26
10.12.03	9,37 ± 0,03 n = 3	11 ± 4 n = 3	6,34 ± 0,66 n = 3	0,25 ± 0,01 n = 51	2,79 ± 0,06 n = 51

**Tab. 13** Zusammenfassung der charakterisierten Parameter der in dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen aus Schweineherzventrikelgewebe.  $pK_D$ : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des Radioliganden [ $^3H$ ]NMS.  $B_{max}$ : Anzahl der Bindungsstellen. Der Proteingehalt ist bezogen auf die unverdünnte Membransuspension.  $k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von [ $^3H$ ]NMS, gewonnen aus Dissoziationsexperimenten unter Kontrollbedingungen. Aufgeführt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.  $t_{1/2}$ : Halbwertszeit der [ $^3H$ ]NMS-Dissoziation unter Kontrollbedingungen. Die Experimente wurden durchgeführt in Mg, Tris, Cl,  $P_i$ -Puffer.

Homogenat/Tag der Herstellung		pK <sub>D</sub>	B <sub>max</sub> (pmol/mg <sub>Prot.</sub> )	Proteingehalt (mg/ml)	k <sub>-1</sub>	t <sub>1/2, diss</sub> (min)
M <sub>1</sub>	19.04.04	9,13*	3,77	2,52 ± 0,15 n = 3	0,083 ± 0,001 n = 46	8,47 ± 0,12 n = 46
	03.05.04	9,14 ± 0,05 n = 3	4,63 ± 0,39 n = 3	2,51 ± 0,14 n = 3	0,079 ± 0,001 n = 40	8,82 ± 0,11 n = 40
M <sub>2</sub>	06.04.04	8,98 ± 0,06 n = 3	3,54 ± 0,28 n = 3	2,19 ± 0,10 n = 3	0,23 ± 0,01 n = 42	3,07 ± 0,07 n = 42
	14.04.04	9,38*	2,20	2,72 ± 0,10 n = 3	0,21 ± 0,01 n = 24	3,55 ± 0,28 n = 24
	14.10.04	9,15 ± 0,04 n = 3	4,39 ± 0,40 n = 3	2,96 ± 0,11 n = 3	0,25 ± 0,01 n = 22	2,78 ± 0,08 n = 22
	19.10.04	9,00 ± 0,09 n = 3	5,12 ± 0,80 n = 3	3,21 ± 0,13 n = 3	0,23 ± 0,01 n = 13	3,05 ± 0,11 n = 13
	19.04.05	8,93 ± 0,11 n = 3	5,75 ± 0,27 n = 3	2,79 ± 0,25 n = 3	n.b.	n.b.
M <sub>3</sub>	11.05.04	8,76 <sup>1</sup> ± 0,17 n = 4	20,10 ± 2,58 n = 3	2,50 ± 0,19 n = 3	0,051 ± 0,001 n = 57	14,06 ± 0,32 n = 57
	04.04.05	8,34 ± 0,08 n = 3	20,15 ± 0,95 n = 3	5,93 ± 0,12 n = 3	n.b.	n.b.
M <sub>4</sub>	17.05.04	9,19 ± 0,02 n = 3	8,03 ± 0,42 n = 3	2,27 ± 0,08 n = 3	0,049 ± 0,001 n = 52	14,43 ± 0,34 n = 52
M <sub>5</sub>	16.04.04	8,96 ± 0,05 n = 3	6,84 ± 0,19 n = 3	1,78 ± 0,19 n = 3	0,031 ± 0,001 n = 38	22,80 ± 0,43 n = 38
	22.04.04	9,02 ± 0,04 n = 3	5,26 ± 0,69 n = 3	2,15 ± 0,12 n = 3	0,036 ± 0,001 n = 48	19,16 ± 0,38 n = 48
	29.04.04	8,88 <sup>1</sup> ± 0,06 n = 4	7,56 ± 0,59 n = 3	3,14 ± 0,15 n = 3	n.b.	n.b.

**Tab. 14** Zusammenfassung der charakterisierten Parameter der in dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen, die aus CHO-Zellen gewonnen wurden. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Mit \* gekennzeichnete Werte entstammen einer Einzelbestimmung. Die [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungs-Experimente wurden durchgeführt in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer. Abkürzungen wie in Legende zu Tab. 13 erläutert.

<sup>1</sup> Das Steigungsmaß n war bei jeweils einem von 4 durchgeführten Experimenten mit -1,14 bzw. -1,12 signifikant verschieden von -1 (F-Test, p < 0,05).

n.b.: Homogenate wurden nicht in Dissoziationsversuchen eingesetzt.

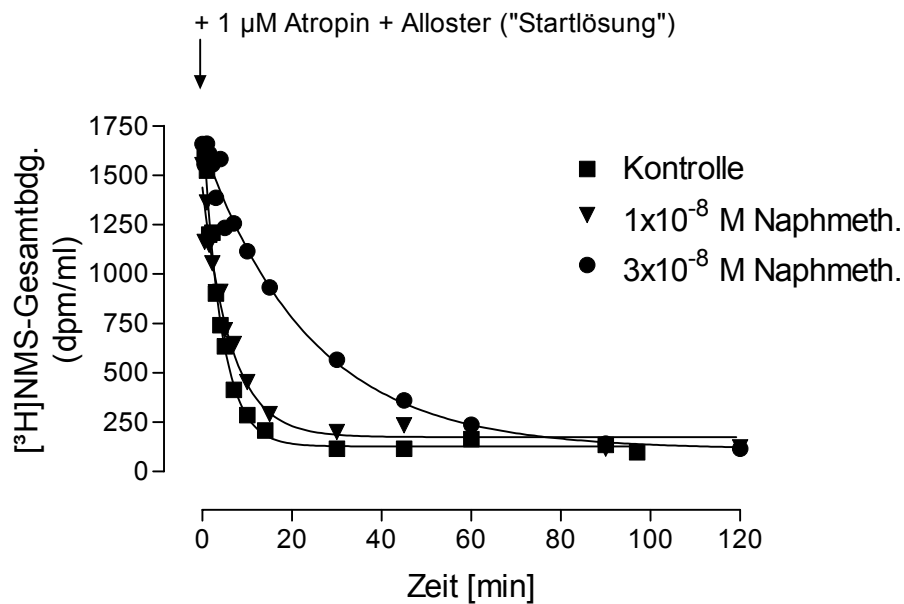
### **3.2 Vergleich: Komplette [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationsversuche und 2-Punkt-Dissoziationsversuche**

Die Affinität allosterischer Testsubstanzen zu Orthoster([<sup>3</sup>H]NMS)-besetzten muskarinischen Rezeptoren wurde mittels Dissoziationsexperimenten bestimmt. Diese ermöglichen es, eine eindeutige Aussage darüber zu geben, ob die Testsubstanzen eine allosterische Interaktion mit dem Orthoster-Rezeptor-Komplex eingehen.

Hierzu wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze verwendet. Bei einem kompletten Dissoziationsversuch wird der Dissoziationsverlauf, der durch Zugabe von 1µM Atropin messbar gemacht wird, durch mehrere Messpunkte genau beschrieben. Bei den sog. 2-Punkt-Dissoziationsexperimenten lässt sich durch Probennahme zum Zeitpunkt  $t = 0$  (Gesamtbindung) vor Zugabe der Atropinlösung und nach einem definierten Zeitraum  $t$  nach Atropinzugabe auf den Dissoziationsverlauf rückschließen (s. 2.3.5;  $t = 25\text{min}$  ( $M_1$ );  $5\text{min}$  ( $M_2$ );  $35\text{min}$  ( $M_3$ );  $33\text{min}$  ( $M_4$ );  $50\text{min}$  ( $M_5$ )). Durch die 2-Punkt-Dissoziationsexperimente lässt sich sowohl der experimentelle Aufwand, als auch der Materialverbrauch stark reduzieren.

Beide Methoden wurden für die allosterische Substanz Naphmethonium sowohl mit Membranen aus Schweineherzventrikelgewebe als auch mit Membranen aus CHO-Zellen verglichen.

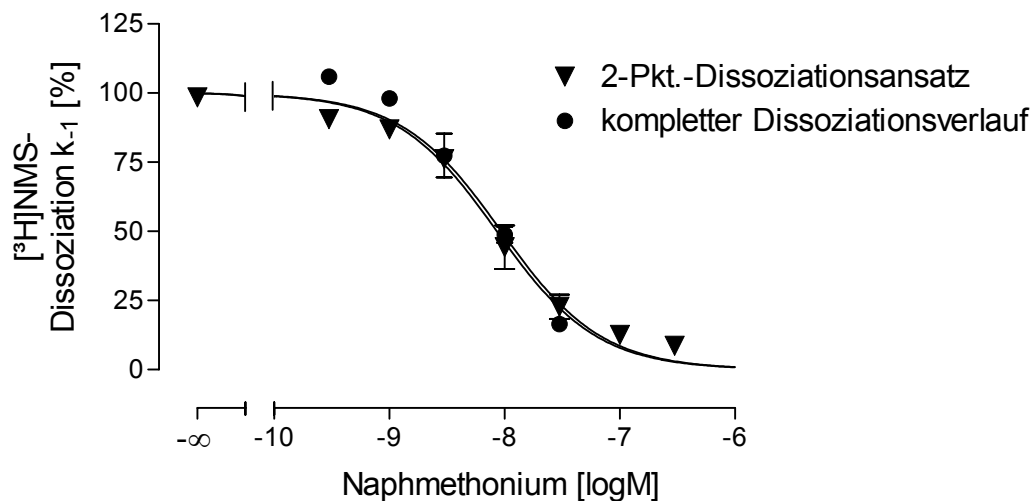
Die folgende Abbildung stellt exemplarisch drei typische Dissoziationsverlaufskurven eines kompletten Dissoziationsexperiments dar. Durch steigende Konzentrationen des Allosters Naphmethonium wird die Dissoziation des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS verzögert.



**Abb. 9** Effekt der angegebenen Konzentrationen Naphmethonium auf den Zeitverlauf der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in einem repräsentativen Experiment mit Schweineherzhomogenat in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer. Ordinate:  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gesamtbindung in dpm/ml, Abszisse: Zeitverlauf nach Zugabe der „Startlösung“ in Minuten. Kurvenanpassung: Gleichung 15.

Die apparenten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}$ , die durch nichtlineare Regressionsanalyse gewonnen werden, lassen sich in Prozent der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der Kontrollkurve in Abwesenheit eines allosterischen Modulators ausdrücken und gegen die Konzentration des Allostere (logM) auftragen. Mittels computergestützter nichtlinearer Regressionsanalyse gemäß Gleichung 4 erhält man sigmoidale Konzentrations-Effekt-Kurven die Aufschluss über die Affinität der Testsubstanz zum Orthoster-besetzten Rezeptor geben.

Abb. 10 zeigt die mit beiden Methoden ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven am Beispiel der Substanz Naphmethonium.



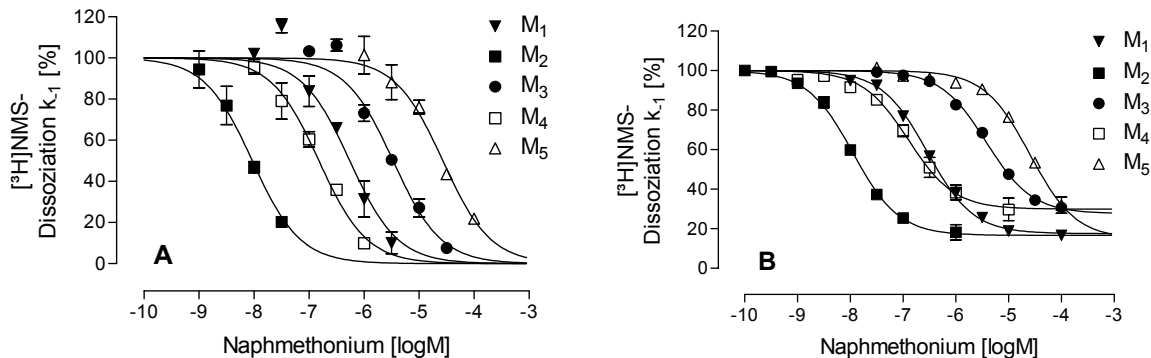
**Abb. 10** Vergleich der Konzentrations-Effekt-Kurven für den Einfluss des allosterischen Modulators Naphmethonium auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des muskarinischen Antagonisten  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in Mg, Tris,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{P}_i$ -Puffer am Schweineherzhomogenat in Bezug auf die experimentelle Methode. Ordinate: apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf den Kontrollwert in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: Konzentration des eingesetzten allosterischen Modulators ( $\log\text{M}$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4. Weder das untere noch das obere Plateau wichen statistisch signifikant von 0 bzw. 100 % ab (F-Test,  $p > 0,05$ ) und wurden auf den entsprechenden Wert festgesetzt. Das Steigungsmaß  $n$  konnte in beiden Fällen auf  $-1$  festgelegt werden, da sich auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied ergab.

Zur Zusammenfassung mehrerer Versuche wurden die Konzentrationswerte der Einzelexperimente vereinigt und daraus eine neue Kurve generiert, aus der der Affinitätsparameter  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$  entnommen wurde.

Die beiden dargestellten Kurven weisen  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Werte von  $8,07 \pm 0,05$  für die Versuche mit der Methode der 2-Punkt-Dissoziation und  $8,03 \pm 0,07$  für die Methode mit kompletten Dissoziationsverläufen auf, was keinen statistisch signifikanten Unterschied darstellt. In der Literatur findet man für Naphmethonium einen  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert von  $8,36 \pm 0,09$  [47]. Ein ungepaarter t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den hier bestimmten Werten ( $p > 0,05$ ).

Die beiden Methoden wurden mit Hilfe von Naphmethonium auch an Membranen aus CHO-Zellen und somit an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Die Versuche hierzu wurden an einem

Tomtec Harvester 96<sup>®</sup> durchgeführt. Die resultierenden Kurven sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.



**Abb. 11** Konzentrations-Effekt-Kurven für den Einfluss von Naphmethonium auf die apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Orthosters  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen in Membranen gewonnen aus CHO-Zellen in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer. Ordinate: apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_1$  in Prozent bezogen auf den Kontrollwert. Abszisse: Konzentration von Naphmethonium (logM). Kurvenanpassung: Gleichung 4. **A** Daten gewonnen aus Versuchen mit kompletten Dissoziationsverläufen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. **B** Daten gewonnen mit Hilfe von 2-Punkt-Dissoziationsversuchen, in denen die Datenpunkte doppelt bestimmt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Alle gezeigten Kurven zeigen ein Steigungsmaß  $n$ , das nicht signifikant unterschiedlich von  $-1$  ist. Das obere und untere Plateau der Kurven der kompletten Dissoziationsversuche sowie das obere Plateau der 2-Punkt-Dissoziationskurven konnten auf 100 bzw. 0 % festgesetzt werden, da sie sich nicht signifikant von diesen Werten unterschieden (F-Test,  $p > 0,05$ ). Lediglich die unteren Plateaus der 2-Punkt-Dissoziationskurven zeigten einen signifikanten Unterschied zu 0 % und wurden deshalb mittels computergestützter Regressionsanalyse frei berechnet. Die Versuche waren jedoch nicht darauf ausgerichtet, das untere Plateau der Kurven zu bestimmen, sondern die Affinitäten zum  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor in Form der  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Werte zu ermitteln. Diese Affinitätsparameter stimmen sehr gut mit den aus Versuchen mit kompletten Dissoziationsverläufen gewonnenen Werten überein, wie aus Tab. 15 ersichtlich ist.

Methode	M <sub>1</sub> *	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
<b>komplette Diss.</b>	6,26 ± 0,09	8,03 ± 0,07	5,47 ± 0,05	6,82 ± 0,05	4,57 ± 0,05
<b>2-Punkt-Diss.</b>	6,54 ± 0,03	7,95 ± 0,04	5,42 ± 0,03	6,90 ± 0,03	4,59 ± 0,06

**Tab. 15** Vergleich der pEC<sub>0,5diss</sub>-Werte von kompletten Dissoziationsexperimenten und 2-Punkt-Dissoziationsexperimenten mit Naphmethonium an Membranen mit den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. \* Ein ungepaarter t-Test zeigte hier einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Werten (p = 0,02).

Ein ungepaarter t-Test ergab, dass sich die pEC<sub>0,5diss</sub>-Werte der kompletten Dissoziationsexperimente bis auf eine Ausnahme (M<sub>1</sub>) nicht signifikant von den Ergebnissen aus 2-Punkt-Dissoziationsexperimenten unterscheiden. Der Unterschied der beiden Werte am M<sub>1</sub>-Rezeptor (0,3 log Einheiten) ist in Bezug auf das Subtypselektivitätsfenster M<sub>2</sub>-M<sub>5</sub> von ca. 3,5 log Einheiten aber kaum von Bedeutung. Angesichts der methodischen Erleichterung wurde somit dem 2-Punkt-Dissoziationsverfahren der Vorzug gegeben.

### **3.3 Modulation der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung an muskarinische M<sub>2</sub>-Rezeptoren durch W84 und Derivate**

Da die methodischen Voruntersuchungen eine Äquivalenz der beiden Methoden zur [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationsmessung ergeben haben, wurden die folgenden kinetischen Experimente mit der effizienteren und materialsparenden 2-Punkt-Dissoziationsmethode durchgeführt. Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Modulatoren wurden heterologe Interaktionsexperimente (siehe 2.3.3) unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Durch diese Experimente konnte der Parameter K<sub>A</sub> als Maß für die Affinität der Testsubstanzen zum freien Rezeptor sowie der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  als Maß für die gegenseitige Affinitätsbeeinflussung zwischen Testsubstanz und [<sup>3</sup>H]NMS bestimmt werden.

Alle unter 3.3 dargestellten Ergebnisse wurden in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer bei 37°C ermittelt. Die Rezeptoren stammten, soweit nicht ausdrücklich anders erwähnt, aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins.

### 3.3.1 Einfluss einer ein- bzw. beidseitigen Monomethylierung der Seitenkette verglichen mit einer Dimethylierung

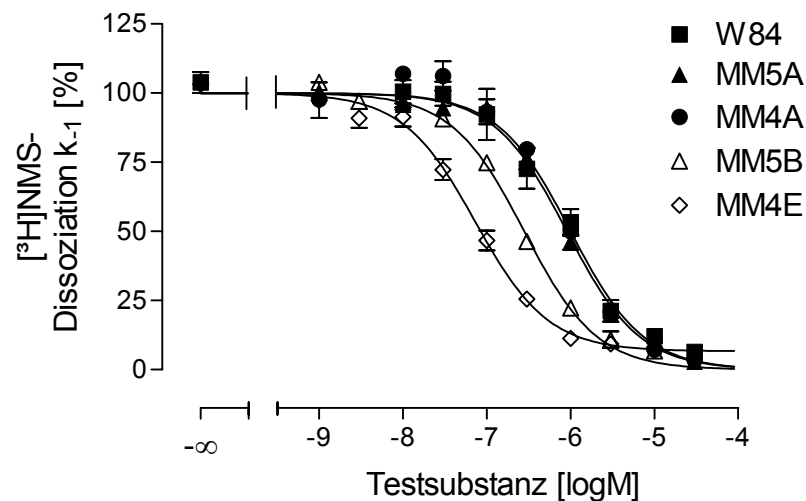
Um die Frage zu klären, ob ein- bzw. beidseitige Mono- bzw. Dimethylierung einen Vorteil im Hinblick auf Affinität bzw. Kooperativität bringen, wurden entsprechende Derivate von W84 verglichen. Die Strukturformeln der im folgenden Abschnitt besprochenen Verbindungen sind in Tab. 16 dargestellt.

	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>3</sup>	Y <sup>1</sup>	Y <sup>2</sup>
W84	H	H	H	H	H
MM5A	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
OS30	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
MM4A	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
WB41	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H
MM5B	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
OS72	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
MM4E	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

**Tab. 16** Strukturformeln der W84-Derivate. Die Substanzen OS30, WB41 und OS72 wurden von Raasch et al. (2002) [48] untersucht und sind hier zu Vergleichszwecken aufgeführt.

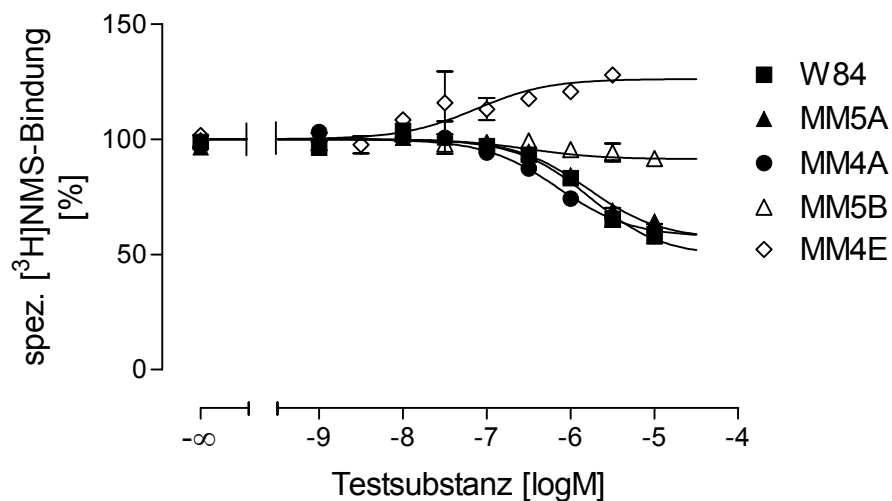
Abb. 12 und Abb. 13 zeigen die Ergebnisse der besprochenen Alkan-Bisammonium-Verbindungen am [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten und am freien Rezeptor.





**Abb. 12** Interaktion der Modulatoren W84, MM5A, MM5B, MM4A und MM4E mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten  $\text{M}_2$ -Rezeptoren in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei  $37^\circ\text{C}$ . Ordinate: Geschwindigkeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit eines allosterischen Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-4 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Alle Kurven zeigten eine Steigung, die nicht signifikant verschieden von  $-1$  ist und deshalb auf diesen Wert festgesetzt werden konnte. Das obere Plateau wurde auf 100% festgesetzt, da ein statistischer Vergleich auch hier keinen signifikanten Unterschied zeigte. Lediglich die Kurve der Substanz MM4E hat ein unteres Plateau, dass mit 7% signifikant von 0% abweicht. Diese Abweichung hat jedoch keinen Einfluss auf die Ermittlung des  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wertes und kann somit vernachlässigt werden. Bei allen anderen Substanzen konnte das untere Plateau ohne signifikante Unterschiede auf 0% festgesetzt werden.



**Abb. 13** Einfluss der angezeigten allosterischen Modulatoren auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,2 nM) an  $\text{M}_2$ -Rezeptoren. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration des Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug 3-4 Stunden.

In der folgenden Tabelle sind die Parameter aus kinetischen Versuchen und heterologen Interaktionsexperimenten zu den entsprechenden Substanzen zusammengefasst.

	$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \times K_A)$	$pEC_{0,5diss}$
W84	$5,86 \pm 0,12$ n = 3	$-0,40 \pm 0,06$ n = 3	5,46	$6,13 \pm 0,08$ n = 4
MM5A	$5,87 \pm 0,05$ n = 3	$-0,33 \pm 0,02$ n = 3	5,54	$6,05 \pm 0,03$ n = 4
OS30 <sup>a</sup>	$6,90 \pm 0,03$ n = 3	$-0,04 \pm 0,03$ n = 3	6,86	$6,87 \pm 0,04$ n = 3
MM4A	$6,23 \pm 0,09$ n = 3	$-0,33 \pm 0,03$ n = 3	5,90	$6,08 \pm 0,02$ n = 3
WB41 <sup>a</sup>	$6,73 \pm 0,08$ n = 3	$-0,31 \pm 0,02$ n = 3	6,42	$6,49 \pm 0,04$ n = 3
MM5B	$6,51 \pm 0,02$ n = 3	$-0,06 \pm 0,02$ n = 3	6,45	$6,55 \pm 0,02$ n = 3
OS72 <sup>a</sup>	$7,26 \pm 0,03$ n = 3	$0,19 \pm 0,02$ n = 3	7,45	$7,26 \pm 0,02$ n = 3
MM4E	$7,08 \pm 0,44$ n = 3	$0,16 \pm 0,00$ n = 3	7,24	$7,15 \pm 0,08$ n = 4

**Tab. 17** Zusammenfassung der Parameter der Konzentrations-Effekt-Kurven aus heterologen Interaktionsexperimenten sowie aus Dissoziationsexperimenten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

<sup>a</sup>: Werte wurden zu Vergleichszwecken aus Muth et al. (2003) [47] entnommen.

Laut dem ternären Modell allosterischer Interaktion muss das Produkt der Kenngrößen  $K_A$  und  $\alpha$  bzw. die Summe der logarithmierten Werte  $pK_A$  und  $p\alpha$ , gewonnen aus heterologen Interaktionsexperimenten, dem Affinitätsparameter zum [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor  $EC_{0,5diss}$  bzw.  $pEC_{0,5diss}$  entsprechen. Im Falle der vorliegenden Daten stimmen diese Werte, bis auf die Substanzen W84 und MM5A, gut überein. Die Abweichung beträgt für die Substanz W84 ca. 0,7 und für die Substanz MM5A ca. 0,5 log Einheiten. Aufgrund dieser Abweichung wurde für die beiden Verbindungen eine zusätzliche Auswertung mittels einer modifizierten Ehlert-Gleichung vorgenommen, in der der Parameter  $\alpha$  durch den Quotienten aus  $EC_{0,5diss}$  und  $K_A$  ersetzt ist und der Parameter  $K_A$  somit unter Angabe von  $EC_{0,5diss}$  ermittelt wurde. Der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  errechnet sich im Folgenden aus der Differenz zwischen  $pEC_{0,5diss}$  und  $pK_A$ . Die so erhaltenen Parameter sind in Tab. 18 angegeben.

	$pK_A$	$p\alpha$	$pEC_{0,5diss}$
W84	$6,39 \pm 0,02$ $n = 3$	-0,26	$6,13 \pm 0,08$ $n = 4$
MM5A	$6,29 \pm 0,01$ $n = 3$	-0,24	$6,05 \pm 0,03$ $n = 4$

**Tab. 18** Ermittelte Parameter für W84 und MM5A durch Auswertung mit Hilfe der modifizierten Ehlert-Gleichung unter Einbeziehung von  $EC_{0,5diss}$  (siehe 4.2).

Diese Werte für W84 stehen, im Gegensatz zu den Werten aus der Auswertung mit der nicht modifizierten Ehlert-Gleichung, im Einklang mit den in der Literatur [48] angegebenen Werten. Sie werden im Folgenden zur Betrachtung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen herangezogen. Das Vorgehen zur Auswertung wird im Abschnitt 4.2 diskutiert.

Die Substanz MM5A, die sich von der Grundsubstanz W84 durch eine Monomethylierung in einer der beiden Propylseitenketten unterscheidet, zeigt dieser gegenüber keine relevanten Veränderungen bezüglich der Affinität zum freien ( $pK_A$ ) und zum [ $^3H$ ]NMS-besetzten Rezeptor ( $pEC_{0,5diss}$ ) sowie der Kooperativität ( $p\alpha$ ). Eine einseitige Dimethylierung der Seitenkette (OS30) führt hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Affinitäten sowohl am [ $^3H$ ]NMS-besetzten, als auch am freien Rezeptor wie von Raasch et al. (2002) [48] beschrieben. Die Kooperativität wird dabei von einem negativen auf ein nahezu neutrales Niveau gehoben. Die Substanz MM4A, welche eine Monomethylierung an beiden Seitenketten des Moleküls aufweist, zeigt verglichen mit der Grundsubstanz W84 ebenfalls weder eine signifikante Veränderung der Affinität zum [ $^3H$ ]NMS-besetzten noch zum freien Rezeptor. Die Kooperativität bleibt hier auch im negativen Bereich.

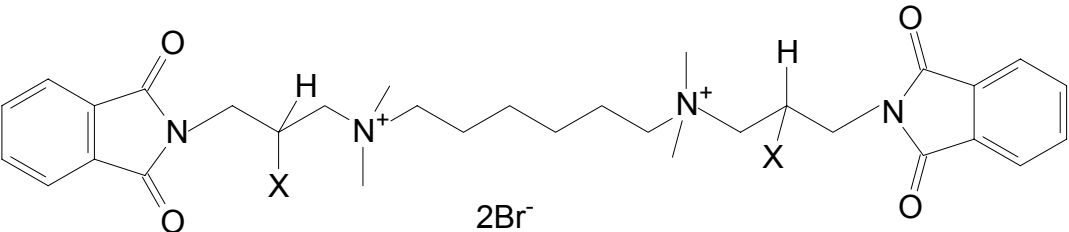
Durch die Einführung einer Methylgruppe am lateralen Ringsystem (WB41) wird das Affinitätsniveau im Vergleich zur Ausgangsverbindung (W84) angehoben, während die Kooperativität unbeeinflusst bleibt [48]. Eine zusätzliche Monomethylierung der Seitenkette (MM5B) nimmt nur geringen Einfluss auf die Affinitäten, führt jedoch zu nahezu neutraler Kooperativität. Eine Doppelmethylierung der Seitenkette (OS72) hat, wie bei den Phthalimid-Verbindungen, eine weitere Steigerung der Affinitäten zur Folge. Durch diese Strukturveränderungen erhält man somit eine hoch affine Verbindung, die mit [ $^3H$ ]NMS positiv kooperativ interagiert [48].

Die Methylierung beider lateralen Ringsysteme, sowie eine beidseitige Monomethylierung der Seitenketten (MM4E), führt ebenfalls zu einer hoch affinen,

positiv kooperativen Verbindung, die nur knapp unter dem Affinitätsniveau von OS72 liegt.

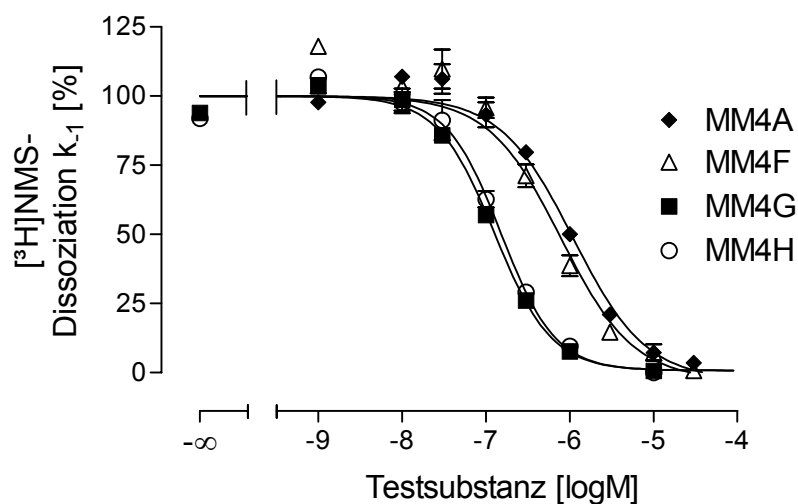
### 3.3.2 Einfluss der Größe der Substituenten an der Seitenkette

Zur Klärung der Frage, welchen Einfluss die Größe des Substituenten an den Seitenketten des W84-Grundgerüsts auf Affinität und Kooperativität hat, wurden die in Tab. 19 dargestellten Substanzen untersucht.

	
	X
MM4A	CH <sub>3</sub>
MM4F	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
MM4G	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
MM4H	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

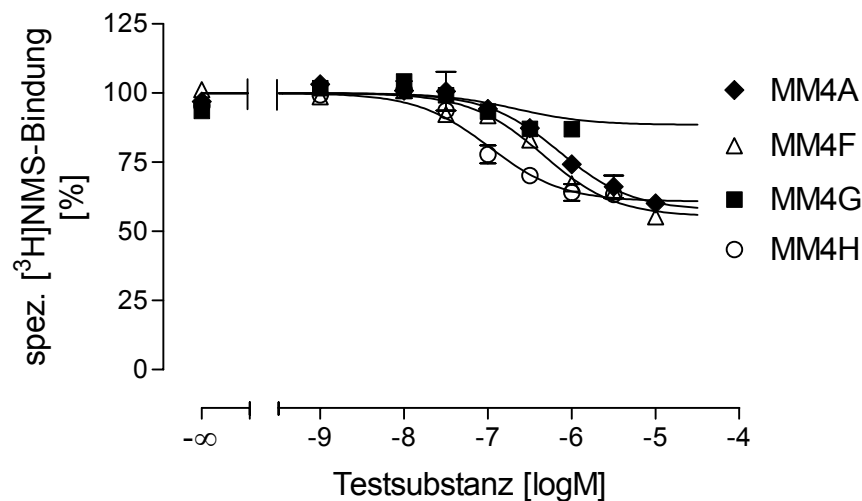
**Tab. 19** Strukturformeln von W84-Derivaten mit unterschiedlich großen Seitenkettensubstituenten

Die Effekte dieser Verbindungen auf die Dissoziationsgeschwindigkeit sowie die Gleichgewichtsbindung von [<sup>3</sup>H]NMS am M<sub>2</sub>-Rezeptor sind in Abb. 14 und Abb. 15 dargestellt.



**Abb. 14** Interaktion der Modulatoren MM4A, MM4F, MM4G und MM4H mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten  $\text{M}_2$ -Rezeptoren in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei  $37^\circ\text{C}$ . Ordinate: Geschwindigkeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle in Abwesenheit eines allosterischen Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-4 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Die oberen Plateaus der Kurven wurde auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateaus der Kurven zeigten keinen signifikanten Unterschied zu 0% und wurden auf diesen Wert festgesetzt. Die Steigungen der Kurven der Substanzen MM4G und MM4H waren signifikant steiler als  $-1$  ( $n(\text{MM4G}) = -1,28 \pm 0,10$ ;  $n(\text{MM4H}) = -1,34 \pm 0,16$ ). Bei den Verbindungen MM4A und MM4F war dies nicht der Fall und die Steigung konnte somit auf den Wert  $-1$  festgesetzt werden.



**Abb. 15** Einfluss der angezeigten allosterischen Modulatoren auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,2 nM) an  $\text{M}_2$ -Rezeptoren. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration des Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug 3,5-5 Stunden.

Die Ergebnisse der heterologen Interaktionsexperimente der Substanzen MM4G und MM4H, die bereits in den Dissoziationsexperimenten Kurven mit steiler Steigung hervorgebracht haben, sollten neben der Auswertung nach Ehlert [58] zusätzlich Hill analog mittels der 4 Parameter logistischen Gleichung [52] ausgewertet werden, um die Steilheit der Kurve zu kontrollieren. Eine Anpassung und somit eine Auswertung der Kurve der Substanz MM4G war aufgrund der nahezu neutralen Kooperativität der Verbindung nicht möglich. Die Auswertung der Daten der Verbindung MM4H mittels der logistischen Gleichung zeigte, dass auch die Kurve der heterologen Interaktion dieser Substanz mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  eine signifikant steilere Kurve als  $-1$  hervorbrachte ( $n = -1,70 \pm 0,47$ ).

Folgende Tabelle zeigt die erhobenen Daten aus  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsversuchen und heterologen Interaktionsexperimenten.

	$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \times K_A)$	$pEC_{0,5diss}$
MM4A	$6,23 \pm 0,09$ n = 3	$-0,33 \pm 0,03$ n = 3	5,90	$6,08 \pm 0,02$ n = 3
MM4F	$6,43 \pm 0,05$ n = 3	$-0,35 \pm 0,01$ n = 3	6,09	$6,14 \pm 0,07$ n = 3
MM4G	$6,68 \pm 0,15$ n = 4	$-0,08 \pm 0,03$ n = 4	6,60	$6,89 \pm 0,03^*$ n = 4
MM4H	$7,05 \pm 0,03^*$ n = 3	$-0,28 \pm 0,02$ n = 3	6,77	$6,81 \pm 0,03^*$ n = 4

**Tab. 20** Zusammenfassung der Parameter der Konzentrations-Effekt-Kurven aus heterologen Interaktionsexperimenten sowie aus Dissoziationsexperimenten mit [ $^3H$ ]NMS. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*: Steigungsmass n signifikant verschieden von  $-1$  (genaue Werte: siehe Text)

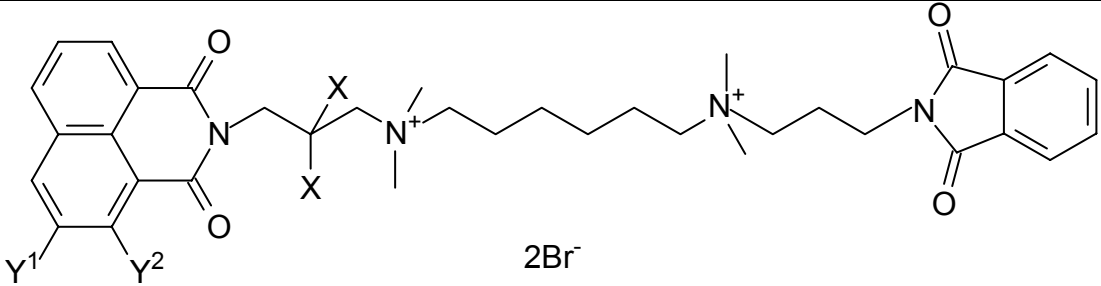
Bei einem Vergleich der Affinitäten der Testsubstanzen zum [ $^3H$ ]NMS-besetzten Rezeptor ( $pEC_{0,5diss}$ -Werte) ist zu sehen, dass der Austausch der Methyl- (MM4A) gegen Ethylgruppen (MM4F) keinen signifikanten Unterschied bewirkt. Erst die Einführung von Propyl- (MM4G) bzw. Isobutylsubstituenten (MM4H) führt zu einer signifikanten Anhebung der Affinität im Vergleich zu den kürzerkettig substituierten Verbindungen, wobei bei einer Vergrößerung des Substituenten von Propyl zu Isobutyl kein weiterer Affinitätsgewinn festzustellen ist. Bei den Verbindungen mit größeren Substituenten (Propyl, Isobutyl) ist des weiteren zu beobachten, dass die erhaltenen Kurven signifikant steiler als  $-1$  sind ( $n = -1,26$  (MM4G) bzw.  $-1,32$  (MM4H)). Dies deutet auf ein komplexeres Bindungsverhalten dieser Substanzen hin, was auf sterische Hindernisse zurückzuführen sein könnte.

Am freien Rezeptor ( $pK_A$ -Werte) ist die schrittweise Vergrößerung der Substituenten verbunden mit einem relativ gleichmäßigen Anstieg der Affinitäten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Ausgangssubstanz MM4A ist erst beim Isobutyl-substituierten MM4H festzustellen. Jedoch kann nur bei der Verbindung mit Propylsubstituenten (MM4G) nahezu neutrale Kooperativität beobachtet werden. Somit scheint eine Substitution der Seitenketten mit Propyl das Optimum in Bezug auf Affinitätsgewinn mit gleichzeitiger Abschwächung der negativen Kooperativität zu sein.



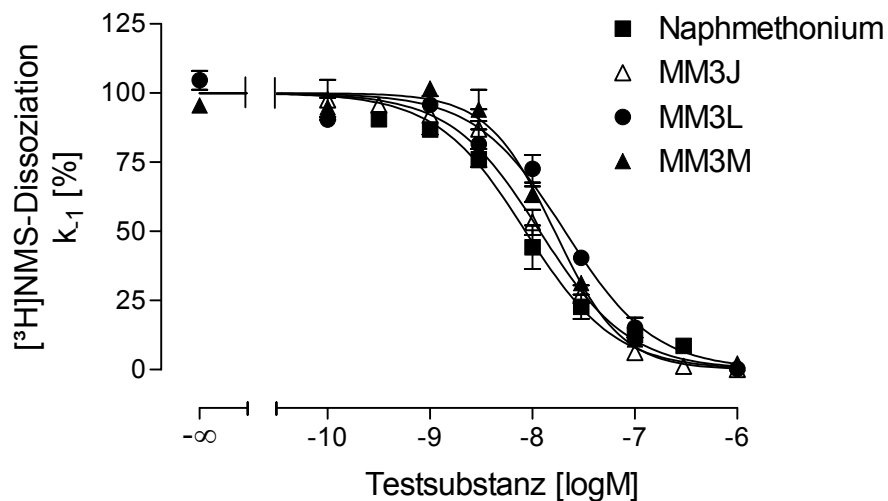
### 3.3.3 Einfluss einer Aminierung bzw. Nitrierung des lateralen Naphthalimidrings

Die im folgenden Abschnitt besprochenen Verbindungen tragen entweder eine Amino- oder eine Nitrogruppe im lateralen Naphthalimid-Ringsystem. Die Substanzen werden verglichen mit den nicht ringsubstituierten Verbindungen WB37 und Naphmethonium. Die Strukturformeln der Substanzen sind Tab. 21 aufgeführt.

			
	Y <sup>1</sup>	Y <sup>2</sup>	X
WB37	H	H	H
Naphmethonium	H	H	CH <sub>3</sub>
MM3J	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>
MM3L	NO <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>
MM3M	H	NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>

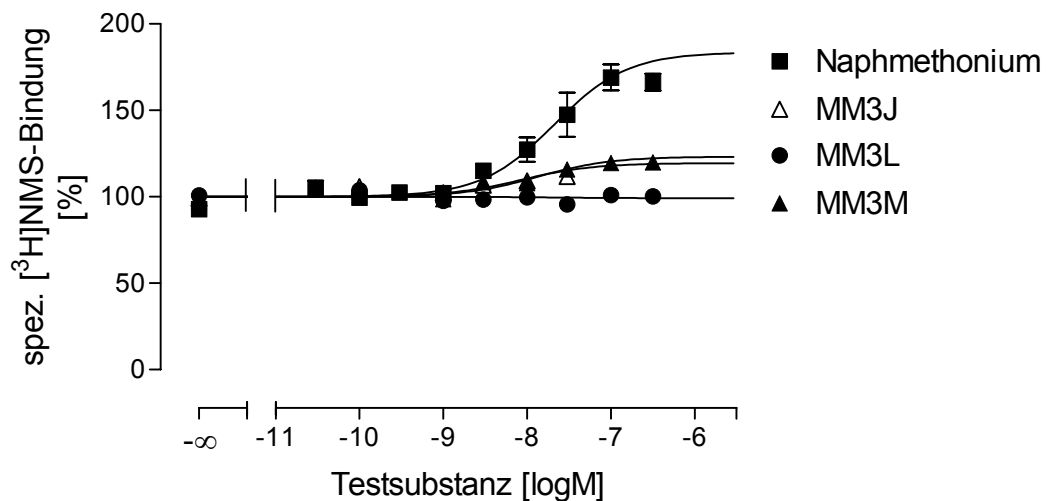
**Tab. 21** Naphthalimid-Derivate

Abb. 16 und Abb. 17 zeigen die Wirkungen der angezeigten Verbindungen an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten und an freien M<sub>2</sub>-Rezeptoren.



**Abb. 16** Interaktion der Modulatoren Naphmethonium, MM3J, MM3L und MM3M mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten  $\text{M}_2$ -Rezeptoren in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei  $37^\circ\text{C}$ . Ordinate: Geschwindigkeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Die oberen und unteren Plateaus zu allen Kurven konnten auf 100 bzw. 0 % festgesetzt werden, da sich kein signifikanter Unterschied zu diesen Werten ergab. Des weiteren zeigten drei von vier Kurven eine nicht signifikant von  $-1$  verschiedene Steigung. Eine Ausnahme bildete hier die Substanz MM3M mit einem Steigungsmass  $n = -1,33 \pm 0,13$ .



**Abb. 17** Einfluss der angezeigten allosterischen Modulatoren auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,2 nM) an  $\text{M}_2$ -Rezeptoren. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration des Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeiten betrugen 4h (MM3M), 6h (MM3J, MM3L) bzw. 8h (Naphmethonium).

Da die Steigung der Kurve der Verbindung MM3M in  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsexperimenten signifikant steiler als  $-1$  war, wurden die heterologen Interaktionsexperimente ebenfalls zusätzlich mittels der logistischen Gleichung [Gleichung 4] ausgewertet. Die Auswertung erbrachte hier, dass die Gleichgewichtsbindungsdaten mit einer Kurve mit der Steigung 1 beschrieben werden konnten.

Die Substanz MM3L führt zu keiner Veränderung der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung und ist somit mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  neutral kooperativ. Der  $\text{pK}_\text{A}$ -Wert ist aus neutral kooperativen Kurven mit der Ehlert-Gleichung nicht bestimmbar. Hierzu wurde die Gleichung dahingehend verändert, dass der Parameter  $\text{pK}_\text{A}$  durch die Differenz aus  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$  und  $\text{p}\alpha$  bzw. der  $\text{K}_\text{A}$ -Wert durch den Quotienten aus  $\text{EC}_{0,5\text{diss}}$  und  $\alpha$  ersetzt wurde. Aus der Kurve kann so unter Angabe des vorher bestimmten Parameters  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$  die Kenngröße  $\text{p}\alpha$  ermittelt werden, welche in Tab. 22 angegeben ist. Der  $\text{pK}_\text{A}$ -Wert wurde nachträglich aus  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}} - \text{p}\alpha$  berechnet. Tab. 22 fasst die Daten aus heterologen Interaktionsexperimenten und Dissoziationsversuchen mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  zusammen.

	$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \times K_A)$	$pEC_{0,5diss}$
WB37	$7,24 \pm 0,13^a$ n = 4	$-0,20 \pm 0,05^a$ n = 4	$7,04^a$	$6,94 \pm 0,30^a$ n = 6
Naphmethonium	$7,44 \pm 0,19$ n = 3	$0,50 \pm 0,06$ n = 3	7,94	$8,07 \pm 0,05$ n = 3
MM3J	$8,03 \pm 0,47$ n = 3	$0,12 \pm 0,05$ n = 3	8,15	$7,93 \pm 0,06$ n = 4
MM3L	$7,65 \pm 0,04^b$ n = 4	$0,03 \pm 0,04$ n = 4	n.b.	$7,68 \pm 0,05$ n = 3
MM3M	$7,82 \pm 0,11$ n = 3	$0,14 \pm 0,03$ n = 3	7,96	$7,77 \pm 0,05^*$ n = 3

**Tab. 22** Zusammenfassung der Parameter der Konzentrations-Effekt-Kurven aus heterologen Interaktionsexperimenten sowie aus Dissoziationsexperimenten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*: Steigungsmass n signifikant verschieden von  $-1$  ( $n = -1,33 \pm 0,13$ )

<sup>a</sup>: Werte wurden zu Vergleichszwecken aus Muth et al. (2003) [47] entnommen.

<sup>b</sup>:  $pK_A$  berechnet aus  $p\alpha$  und  $pEC_{0,5diss}$ , daher  $p(\alpha \times K_A)$  nicht unabhängig berechenbar (n.b.)

Wie bereits von Muth et al. [47] beschrieben, steigt durch eine Vergrößerung des lateralen Ringsystems auf ein Naphthalimidsystem (WB37) sowohl die Affinität zum freien als auch die Affinität zum [ $^3H$ ]NMS-besetzten Rezeptor im Vergleich zur Grundstruktur der Alkan(bis)ammonium-Verbindungen W84 (siehe Tab. 17) deutlich an. Eine Dimethylierung der Seitenkette (Naphmethonium) steigert zusätzlich die Affinität zum [ $^3H$ ]NMS-besetzten Rezeptor und führt somit zu positiver Kooperativität [47].

Eine Substitution des Naphthalimidringsystems mit einer Aminogruppe (MM3J) hat weder einen signifikanten Einfluss auf die Affinität zum [ $^3H$ ]NMS-besetzten noch zum unbesetzten Rezeptor. Da jedoch tendenziell die Affinität zum freien Rezeptor gesteigert wird und gleichzeitig die Affinität zum besetzten Rezeptor leicht, wenn auch nicht signifikant, sinkt, wird die deutliche positive Kooperativität, die beim Naphmethonium zu beobachten ist, bei der aminierten Verbindung MM3J abgeschwächt.

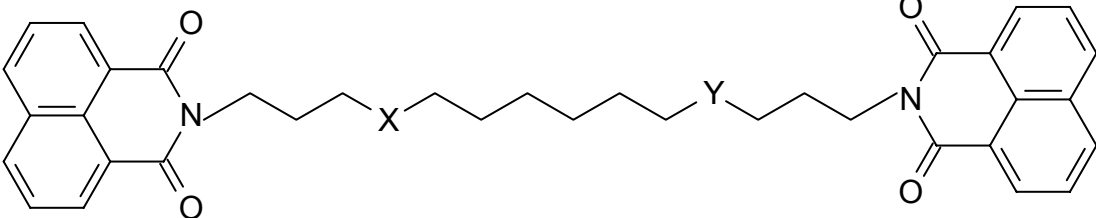
Durch Nitrierung des Naphmethoniums entstehen Verbindungen, die signifikant niedriger affin zum [ $^3H$ ]NMS-besetzten Rezeptor sind. Die Affinität zum freien Rezeptor liegt tendenziell höher als beim Naphmethonium, auch wenn aufgrund der hohen Standardfehler hier keine Signifikanz vorlag. Offenbar ist also der relativ große Nitrosubstituent am Naphthalimidringsystem nicht so stark sterisch störend, dass die

Affinitäten stark beeinflusst würden. Sie liegen tendenziell höher als bei der an den Seitenketten unsubstituierten Verbindung WB37. Die Unterschiede sind allerdings nur am freien Rezeptor signifikant. Die schwache positive Kooperativität, die bei der Verbindung MM3J noch zu beobachten war, bleibt auch bei der 2-substituierten Nitroverbindung MM3M erhalten. Die 3-substituierte Substanz MM3L nimmt kaum Einfluss auf die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Gleichgewichtsbindung.

### 3.3.4 Einfluss eines Stickstoff-Silizium-Austauschs bei W84-Derivaten

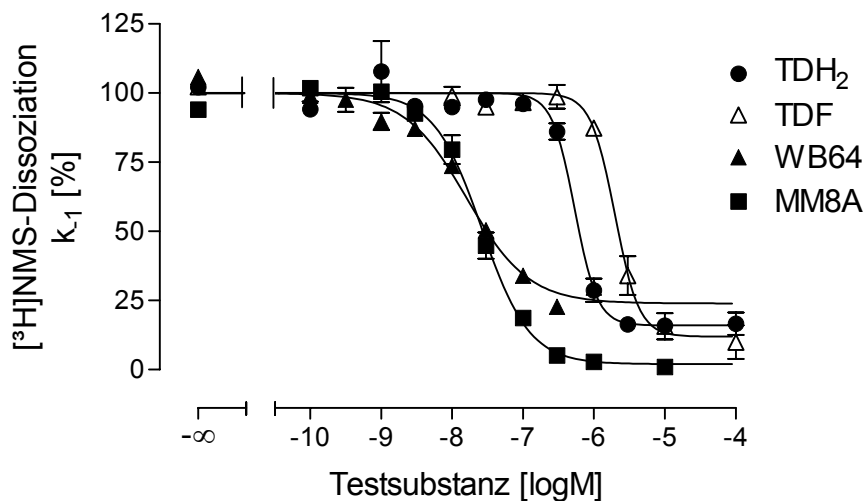
Die im folgenden Abschnitt untersuchten Substanzen WB64, TDH<sub>2</sub> und TDF wurden an M<sub>2</sub>-Membranen aus CHO-Zellen getestet. Ein Vergleich der Daten für WB64 mit Literaturdaten [47], erstellt mit Homogenaten aus Schweineherzventrikelgewebe, ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Tab. 23 zeigt die Strukturformeln der untersuchten Verbindungen.

		
	X	Y
TDH <sub>2</sub>	N <sup>+</sup> H <sub>2</sub>	Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
TDF	N <sup>+</sup> HCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
WB64	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
MM8A	N <sup>+</sup> HCH <sub>3</sub>	N <sup>+</sup> HCH <sub>3</sub>

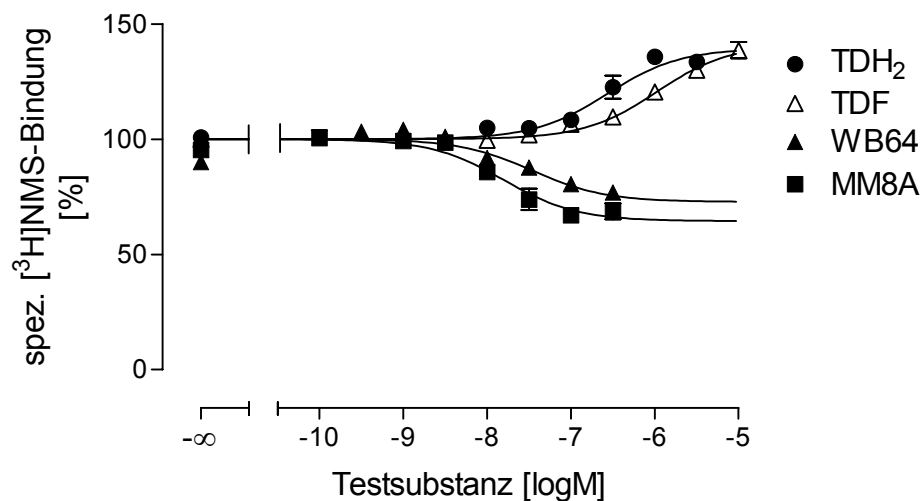
**Tab. 23** Silizium-haltige Verbindungen und strukturverwandte Alkan-Bisammoniumverbindungen

In Abb. 18 und Abb. 19 werden die Kurven der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziationsexperimente und der heterologen Interaktionsversuche zu den dargestellten Substanzen wiedergegeben.



**Abb. 18** Interaktion der Modulatoren TDH<sub>2</sub>, TDF, WB64 und MM8A mit [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten M<sub>2</sub>-Rezeptoren in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: Geschwindigkeit der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten mit doppelten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-6 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Das obere Plateau einer jeden Kurve wurde auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateaus unterscheiden sich alle, bis auf das der Substanz MM8A, signifikant von 0%. Dieser Unterschied nimmt jedoch keinen Einfluss auf die Bestimmung des Affinitätsparameters  $pEC_{0,5diss}$ , wie unter 3.2 gezeigt wurde. Des weiteren konnte nur die Kurve von WB64 mit einer Steigung von  $-1$  angepasst werden. Die Substanzen TDH<sub>2</sub> ( $n = -2,73 \pm 0,30$ ) und TDF ( $n = -2,56 \pm 0,40$ ) zeigten von diesem Wert stark abweichende Steigungen. Die Steigung der Kurve von Substanz MM8A ( $n = -1,29 \pm 0,13$ ) wich nur geringfügig, jedoch statistisch signifikant von  $-1$  ab.



**Abb. 19** Einfluss der angezeigten allosterischen Modulatoren auf die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]NMS (0,4 nM) an  $\text{M}_2$ -Rezeptoren. Ordinate: spezifische [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration des Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-4 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeiten betrugen 3h (MM8A), 5h (WB64) bzw. 6h (TDH<sub>2</sub>, TDF).

Nach einer zusätzlichen Analyse der Daten aus heterologen Interaktionsexperimenten mittels einer Hill analogen Analyse [52] konnten die entsprechenden Kurven der Verbindungen TDF und TDH<sub>2</sub> mit einer Steigung von 1 angepasst werden. Die Kurve der Substanz MM8A zeigte auch im Gleichgewichtsbindungsexperiment eine signifikant von  $-1$  abweichende Kurve ( $n = -1,92 \pm 0,73$ ).

Die folgende Tabelle beinhaltet die Ergebnisse der heterologen Interaktionsexperimente und der Dissoziationsversuche.

	$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \times K_A)$	$pEC_{0,5diss}$
TDH <sub>2</sub>	$6,47 \pm 0,18^C$ n = 4	$-0,24 \pm 0,01^C$ n = 4	$6,23^C$	$6,26 \pm 0,03^{C,*}$ n = 6
TDF	$5,87 \pm 0,12^C$ n = 4	$-0,25 \pm 0,02^C$ n = 4	$5,62^C$	$5,69 \pm 0,04^{C,*}$ n = 4
WB64	$7,52 \pm 0,16^C$ n = 4	$-0,20 \pm 0,03^C$ n = 4	$7,32^C$	$7,78 \pm 0,04^C$ n = 6
MM8A	$7,87 \pm 0,05^*$ n = 4	$-0,26 \pm 0,03$ n = 4	$7,61$	$7,56 \pm 0,04^*$ n = 4

**Tab. 24** Zusammenfassung der Parameter der Konzentrations-Effekt-Kurven aus heterologen Interaktionsexperimenten sowie aus Dissoziationsexperimenten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*: Steigungsmass n signifikant unterschiedlich von  $-1$  (Zahlenwerte: siehe Text)

<sup>C</sup>: Daten aus Versuchen mit CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen

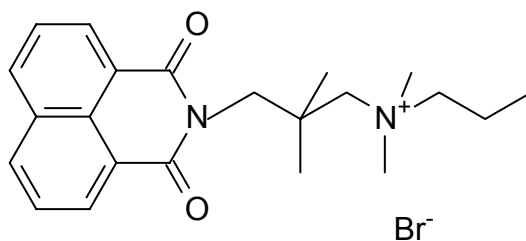
Bei der bistertiären Verbindung MM8A ist im Vergleich zum bisquartären Analogon WB64 nur ein leichter, jedoch signifikanter Rückgang der Affinität zum [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor zu erkennen. Am freien Rezeptor bleibt die Affinität in etwa gleich. Die Silizium-haltigen Derivate zeigen eine deutlich niedrigere Affinität. Der Austausch eines Stickstoffs gegen Silizium führt bei dieser Substanzreihe zu einer signifikanten Abnahme der Affinitäten gegenüber den strukturverwandten Bisammonium-Verbindungen. Die tertiäre Silizium-Verbindung mit einem Fluorethylrest am verbleibenden Stickstoff (TDF) verliert im Vergleich zur bistertiären Bisammoniumverbindung (MM8A) bis zu zwei Zehnerpotenzen an Affinität. Die am Stickstoff unsubstituierte Silizium-Substanz TDH<sub>2</sub> liegt mit ihrem Affinitätsniveau zwischen diesen beiden Verbindungen. Der signifikante Affinitätsverlust gegenüber der Substanz MM8A beträgt immer noch über eine Dekade. Das Niveau der Kooperativität bewegt sich bei allen aufgeführten Substanzen in einem engen Rahmen im negativen Bereich ( $p\alpha = -0,20$  bis  $-0,26$ ), bleibt von den strukturellen Veränderungen also scheinbar unbeeinflusst.

Ein Phänomen, dass bei Silizium-haltigen Modulatoren häufig beobachten werden kann [42, 62], sind steile Kurven bei Dissoziationsverzögerungsexperimenten. Auch bei den Substanzen TDF und TDH<sub>2</sub> wurden Kurven mit signifikant steileren Steigungen als  $-1$  erhalten. Dies deutet, wie bei vielen Vertretern der Silizium-haltigen W84-Derivate, darauf hin, dass diese Modulatoren eine atypische Interaktion mit dem Rezeptor eingehen.

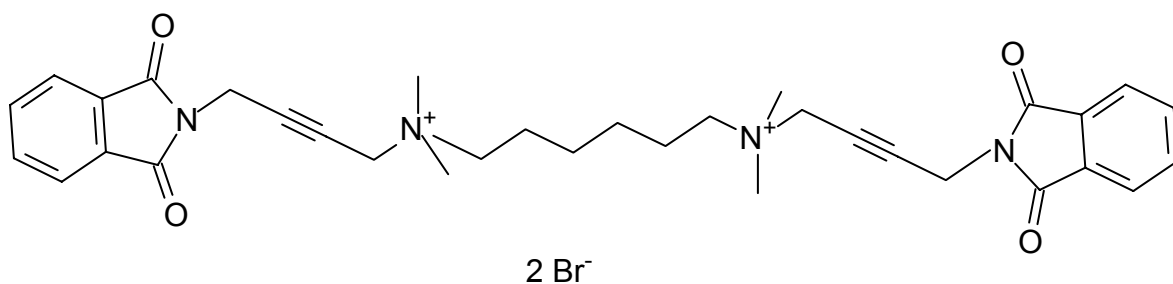


### 3.3.5 Weitere strukturveränderte und verkürzte W84-Derivate

Die Strukturformeln von weiteren untersuchten, stärker strukturveränderten W84-Derivaten sind in Abb. 20 und Abb. 21 dargestellt.

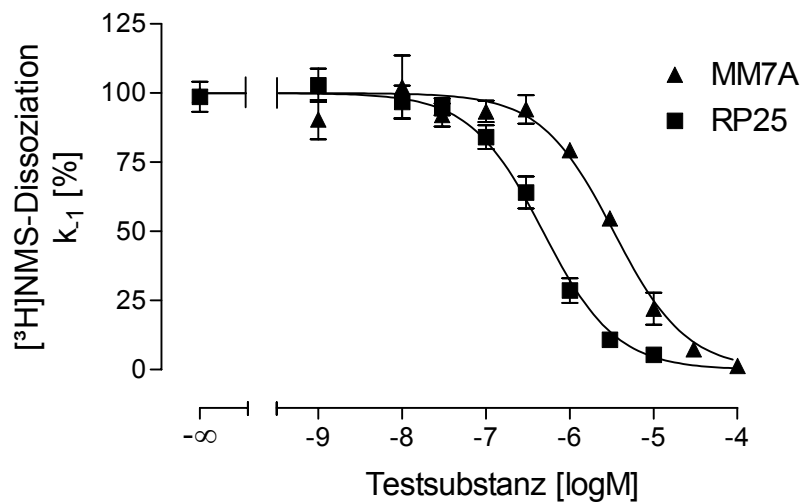


**Abb. 20** Strukturformel der Substanz MM7A



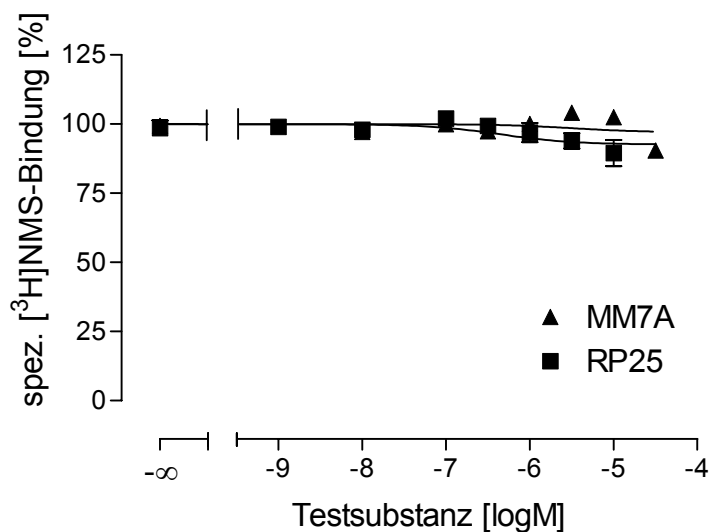
**Abb. 21** Strukturformel der Substanz RP25

In Abb. 22 und Abb. 23 sind die Kurven für die Effekte der oben abgebildeten Verbindungen in  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsversuchen und heterologen Interaktionsexperimenten dargestellt.



**Abb. 22** Interaktion der MM7A und RP25 mit  $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten  $M_2$ -Rezeptoren in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei  $37^\circ\text{C}$ . Ordinate: Geschwindigkeit der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-4 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Das obere und untere Plateau der beiden Kurven wichen nicht signifikant von 100 bzw. 0% ab und wurde auf diese Werte festgesetzt. Beide Kurven zeigten eine nicht signifikant von  $-1$  verschiedene Steigung.



**Abb. 23** Einfluss der angezeigten allosterischen Modulatoren auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,2 nM) an  $\text{M}_2$ -Rezeptoren. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration des Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-4 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeiten betrugen 5h (RP25) bzw. 7h (MM7A).

Tab. 25 zeigt die aus heterologen Interaktionsexperimenten und der Dissoziationsversuchen gewonnenen Parameter dieser Verbindungen.

	$\text{pK}_A$	$\text{p}\alpha$	$\text{p}(\alpha \times K_A)$	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$
MM7A	$5,50 \pm 0,01^*$ n = 4	$-0,02 \pm 0,01$ n = 4	n.b.	$5,48 \pm 0,05$ n = 4
RP25	$6,37 \pm 0,01^*$ n = 3	$-0,05 \pm 0,01$ n = 3	n.b.	$6,32 \pm 0,05$ n = 4
Naphmethonium	$7,44 \pm 0,19$ n = 3	$0,50 \pm 0,06$ n = 3	7,94	$8,07 \pm 0,05$ n = 3

**Tab. 25** Zusammenfassung der Parameter der Konzentrations-Effekt-Kurven aus heterologen Interaktionsexperimenten sowie aus  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsexperimenten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Parameter der Verbindung Naphmethonium sind hier zu Vergleichszwecken abgebildet.

\*:  $\text{pK}_A$  berechnet aus  $\text{p}\alpha$  und  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ , daher  $\text{p}(\alpha \times K_A)$  nicht unabhängig berechenbar (n.b.)

Die relativ kleine Substanz MM7A zeigt eine für ihre Größe unerwartet hohe Affinität zum  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten  $\text{M}_2$ -Rezeptor. Durch die Entfernung einer kompletten

Molekülhälfte im Vergleich zum Naphmethonium wird die Affinität zwar um 2,6 log Einheiten reduziert, diese liegt damit aber auch nur knapp unterhalb der des wesentlich größeren Prototyp-Modulators W84. Der affinitätssteigernde Naphthalimidrest scheint somit hauptsächlich für die Bindung verantwortlich zu sein. Am freien Rezeptor ist der Unterschied zwischen MM7A und Naphmethonium sogar noch geringer (ca. 2 Dekaden). Aufgrund der nahezu neutralen Kooperativität der Substanz MM7A wurde hier, wie auch bei der Substanz RP25, zur Auswertung der heterologen Interaktionsexperimente die modifizierte Version der Gleichung 11 verwendet, bei der  $K_A$  aus dem Quotienten  $EC_{0,5diss}/\alpha$  berechnet wird.

Eine beidseitige Dreifachbindung in der Seitenkette des Moleküls (RP25) verursacht im Vergleich zur Ausgangsverbindung W84 (3.3.1) keine relevante Veränderung der Affinität. Die Substanz RP25 interagiert neutral kooperativ mit [ $^3H$ ]NMS.

### ***3.4 Modulation der [ $^3H$ ]NMS-Bindung an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen durch Alkan-Bisammonium-Verbindungen***

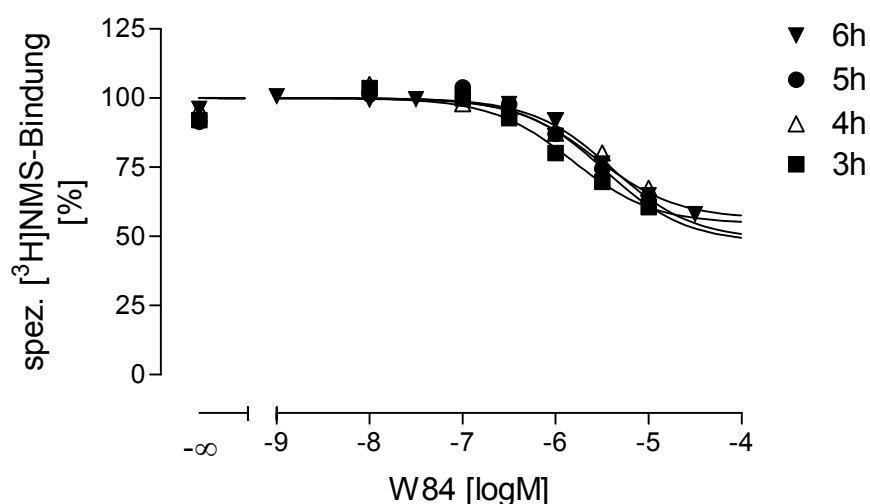
#### **3.4.1 Einfluss der Inkubationszeit auf den Effekt von allosterischen Modulatoren auf die [ $^3H$ ]NMS-Gleichgewichtsbindung unter Verwendung von CHO-Membranen**

Wie bereits unter 2.3 erläutert, erhält man aus den [ $^3H$ ]NMS-Dissoziationsexperimenten die Kenngröße  $EC_{0,5diss}$  als Maß für die Affinität des Allostere zum Orthoster-besetzten Rezeptor. Gemäß dem ternären Komplexmodell nach Ehlert [58] entspricht dieser Parameter dem Produkt aus dem Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_A$ , die mittels heterologer Interaktionsexperimente bestimmt werden. Da die Größen  $pEC_{0,5diss}$  und  $p(\alpha \times K_A)$  korrelieren, sollte ein Vergleich dieser Parameter somit keinen großen Unterschied hervorbringen.

Vor allem bei den Versuchen zur Charakterisierung der Interaktion allosterischer Modulatoren mit den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen stimmten die erhobenen Parameter aus Dissoziationsverzögerungsexperimenten ( $pEC_{0,5diss}$ ) und

Gleichgewichtsbindungsexperimenten ( $p(\alpha \times K_A)$ ) bei längeren Inkubationszeiten (5-6 Stunden) teilweise nicht optimal überein. Die Bestimmung des Affinitätsparameters  $pEC_{0,5diss}$  mittels [ $^3H$ ]NMS-Dissoziationsexperimente weist nur selten große Schwankungen auf, wohingegen die Ermittlung der Kenngröße  $pK_A$  aus heterologen Interaktionsexperimenten oft größeren Schwankungen unterliegt. Es ist denkbar, dass einzelne Substanzen oder auch die Membransuspensionen unter den Inkubationsbedingungen, die für heterologen Interaktionsexperimente nötig sind, nur begrenzt stabil sind und daher die Inkubationszeit einen wichtigen Einfluss auf die Versuchsergebnisse hat. Zur Klärung dieser Frage wurden Gleichgewichtsbindungsversuche mit W84 an Membransuspensionen der Rezeptorsubtypen  $M_1$  und  $M_2$  und mit OS30 an  $M_4$ -Membranpräparationen durchgeführt, da hier die Parameter  $pEC_{0,5diss}$  und  $p(\alpha \times K_A)$  am weitesten von einander abwichen. Die Inkubationszeiten wurden dazu verkürzt und über einen Bereich von 2-6 Stunden variiert. Für W84 ist eine Halbwertszeit des Zerfalls von 7,5 Stunden für die Inkubationsbedingungen (Mg, Tris, Cl,  $P_i$ -Puffer, pH 7,3 bei 37°C) beschrieben [63]. Damit liegen die Inkubationszeiten noch unterhalb einer Halbwertszeit.

Abb. 24 zeigt exemplarisch die Ergebnisse, die mit W84 am  $M_2$ -Rezeptor mit Inkubationszeiten von 3-6 Stunden gewonnen wurden.



**Abb. 24** Einfluss von W84 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an CHO-M<sub>2</sub>-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Versuche wurden durchgeführt in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration des Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-11 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11.

Die Ergebnisse sind in Tab. 26 und Tab. 27 sowie in Abb. 25 zusammengefasst.

Alloster	Rezeptor-Subtyp	Inkubationszeit				
		6 h	5 h	4 h	3 h	2 h
W84	M <sub>1</sub>	4,65 $\pm$ 0,15 n = 7	n.b.	5,18 $\pm$ 0,20 n = 4	5,16 $\pm$ 0,31 n = 4	n.b.
	M <sub>2</sub>	5,48 $\pm$ 0,07 n = 11	5,57 $\pm$ 0,09 n = 4	5,63 $\pm$ 0,16 n = 4	5,88 $\pm$ 0,03 n = 4	n.b.
OS30	M <sub>4</sub>	n.b.	5,25 $\pm$ 0,23 n = 3	5,50 $\pm$ 0,11 n = 9	5,76 $\pm$ 0,13 n = 5	5,55 $\pm$ 0,13 n = 5

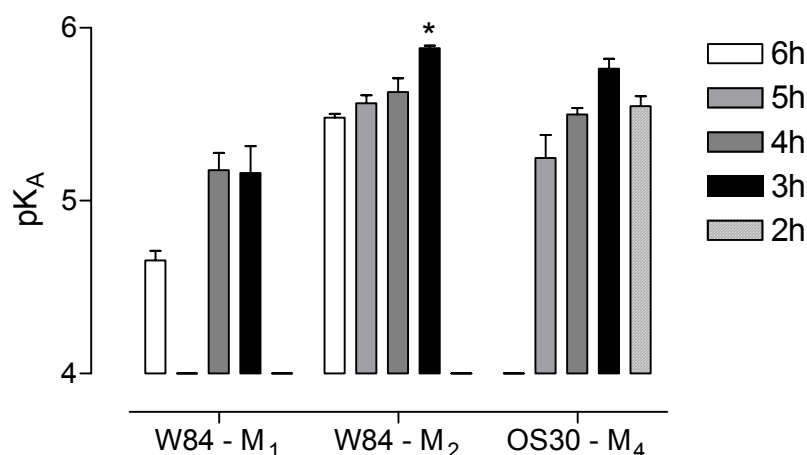
**Tab. 26** pK<sub>A</sub>-Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den angegebenen Rezeptorsubtypen aus heterologen Interaktionsexperimenten unter Variation der Inkubationszeit mit Membranen aus stabil transfizierten CHO-Zellen. Inkubation in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer bei 37°C. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, sowie Anzahl der Experimente.

n.b.: Werte für diese Inkubationszeit nicht bestimmt

Alloster	Rezeptor-Subtyp	Inkubationszeit				
		6 h	5 h	4 h	3 h	2 h
W84	M <sub>1</sub>	-0,24 ± 0,06 n = 7	n.b.	-0,11 ± 0,03 n = 4	-0,11 ± 0,02 n = 4	n.b.
	M <sub>2</sub>	-0,40 ± 0,02 n = 11	-0,42 ± 0,05 n = 4	-0,26 ± 0,04 n = 4	-0,33 ± 0,02 n = 4	n.b.
OS30	M <sub>4</sub>	n.b.	-0,17 ± 0,10 n = 3	-0,16 ± 0,03 n = 9	-0,17 ± 0,04 n = 5	-0,26 ± 0,03 n = 5

**Tab. 27**  $p\alpha$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den angegebenen Rezeptorsubtypen aus heterologen Interaktionsexperimenten unter Variation der Inkubationszeit mit Membranen aus stabil transfizierten CHO-Zellen. Inkubation in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer bei 37°C. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, sowie Anzahl der Experimente.

n.b.: Werte für diese Inkubationszeit nicht bestimmt



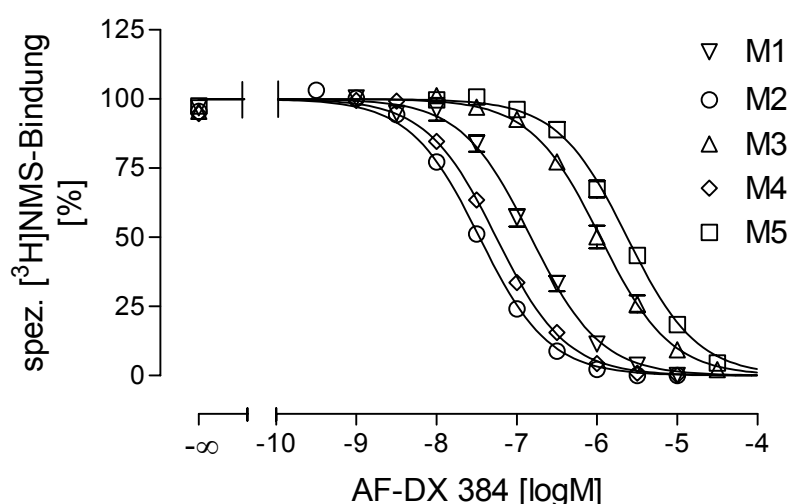
**Abb. 25** Darstellung der  $pK_A$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren am jeweiligen Rezeptorsubtyp in Abhängigkeit von der Länge der Inkubationszeit. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler von 3-11 unabhängigen Experimenten.

\*: signifikanter Unterschied zum Wert mit längster Inkubationszeit.

Aus den aufgeführten Tabellen und Abbildungen ist ersichtlich, dass durch eine Verkürzung der Inkubationszeit tendenziell ein höherer  $pK_A$ -Wert erhalten wird. Einen signifikant unterschiedlichen Wert im Vergleich zum  $pK_A$ -Wert bei der längsten verwendeten Inkubationszeit erhält man allerdings nur mit dem Alloster W84 am Rezeptorsubtyp M<sub>2</sub>.

### 3.4.2 Charakterisierung der Affinität von AF-DX 384 zu den muskarinischen Rezeptorsubtypen unter Gleichgewichtsbedingungen

Zu Beginn wurde die Substanz AF-DX 384 als Referenz untersucht. Bei AF-DX 384 handelt es sich um einen der ersten orthosterischen muskarinischen Antagonisten mit ausgeprägter Subtypselektivität [64]. Abb. 26 zeigt die Ergebnisse der heterologen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Interaktionsexperimente mit AF-DX 384 an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen.



**Abb. 26** Einfluss von AF-DX 384 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von AF-DX 384. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen, wobei einzelne Datenpunkte 1-4-fach bestimmt wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden.

Tränkle et al. zeigten 1998 [65], dass AF-DX 384 in hohen Konzentrationen in der Lage ist, die Dissoziation des orthosterischen Liganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  zu verzögern und damit auch einen allosterischen Charakter aufweist. Die Kurven aus Abb. 26 wurden deswegen nach Ehlert [58] analysiert, da für AF-DX 384 eine stark negativ kooperative Interaktion mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  angenommen wurde. Zur graphischen Darstellung wurden die Werte der Einzelversuche zusammengefasst und der aus 3-4

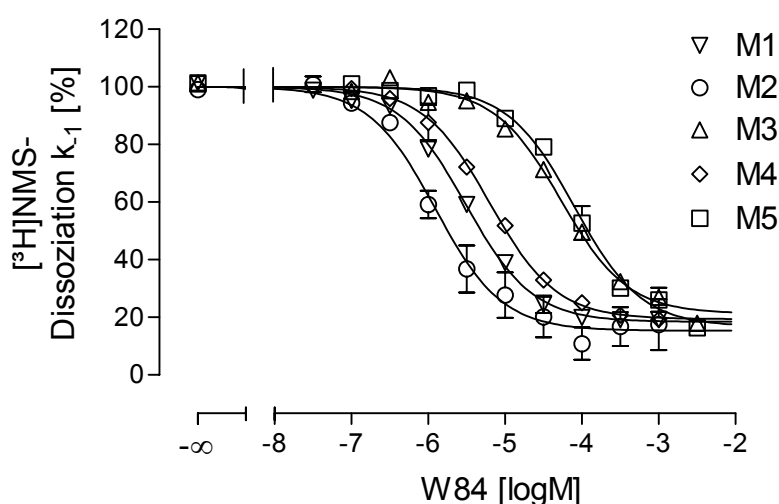


Experimenten gemittelte  $pK_A$ -Wert zur Generierung der Gesamtkurve festgesetzt. Das obere Plateau wurde auf 100 % festgelegt, da kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden konnte. Eine parallele Analyse der Daten hinsichtlich ihrer Steilheit [52] belegte, dass das Steigungsmass der Kurven nicht signifikant von  $-1$  abweicht und die unteren Plateaus der Kurven nicht signifikant verschieden von 0 sind. Die nach der Hill analogen Analyse berechneten  $K_i$ -Werte stimmten mit den  $K_A$ -Werten aus der Ehlert-Analyse überein.

Die Subtypselektivität von AF-DX 384 erstreckt sich über einen Bereich von nahezu zwei Dekaden ( $pK_A (M_2) = 7,66 \pm 0,03$ ;  $pK_A (M_5) = 5,80 \pm 0,04$ ). An zweiter Stelle der Reihenfolge der Affinitäten befindet sich  $M_4$ . Zwischen den Affinitäten zu  $M_2$  und  $M_4$  findet sich ein geringer, jedoch statistisch signifikanter Unterschied ( $pK_A (M_4) = 7,48 \pm 0,02$ ). In der weiteren Reihenfolge liegen die Affinitäten zu  $M_1$  ( $pK_A = 7,00 \pm 0,07$ ) und  $M_3$  ( $pK_A = 6,01 \pm 0,07$ ). Die Werte liegen alle etwa 0,5 Dekaden unter den von Dörje et al. [64] angegebenen Werten (Ausnahme  $M_3$ : Differenz hier 1,1). Es ist anzunehmen, dass das Filtrationssystem bzw. die Art des Versuchsansatzes (im Fall des Tomtec Harvesters in 96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen) Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Einzelversuche an einem Brandel-Harvester unter Verwendung von Glasgefäßen zur Inkubation und Versuche an Handfiltrationsanlagen mit Homogenat aus Schweineherzventrikelgewebe erbrachten höhere  $K_A$ -Werte. Eine Adsorption der Testsubstanz an die Polypropylen-Oberfläche der Reaktionsgefäße ist nicht auszuschließen. Aufgrund nur geringer Mengen an zur Verfügung stehender Substanz konnte der Grund für den Unterschied jedoch nicht weiter verfolgt werden. Da bei den hier durchgeführten Betrachtungen zur Subtypselektivität allerdings das Augenmerk nicht auf absolute Affinitätswerte, sondern auf Affinitätsunterschiede und deren Veränderung gelegt wird, kann eine eventuelle Adsorptionsneigung vernachlässigt werden, da Affinitätsunterschiede hierdurch nicht beeinflusst werden, wie der Vergleich mit den Literaturdaten belegt. Die Betrachtung der Spanne der Subtypselektivität für AF-DX 384 zwischen  $M_2$  und  $M_5$  zeigt, dass sich die hier gefundenen Werte ( $\Delta pK_A = 1,86$ ) nicht entscheidend von den Werten der Autoren Dörje et al. (1991) ( $\Delta pK_A = 1,95$ ) unterscheiden.

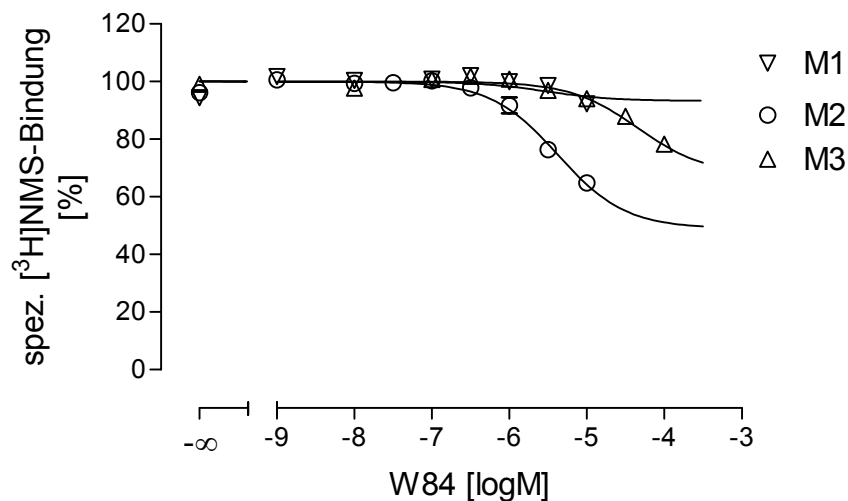
### 3.4.3 Charakterisierung der Affinität von W84 zu den muskarinischen Rezeptorsubtypen

Um Vergleiche der Affinitäten innerhalb der Gruppe der Alkan-Bisammonium-Verbindungen anstellen zu können, wurde als erste Verbindung dieser Substanzklasse die Grundstruktur W84 an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen untersucht. Hierzu wurden sowohl die Affinitäten zum [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor über 2-Punkt-Dissoziationsexperimente (Abb. 27) als auch zum freien Rezeptor mittels heterologer Interaktionsexperimente (Abb. 28) bestimmt.

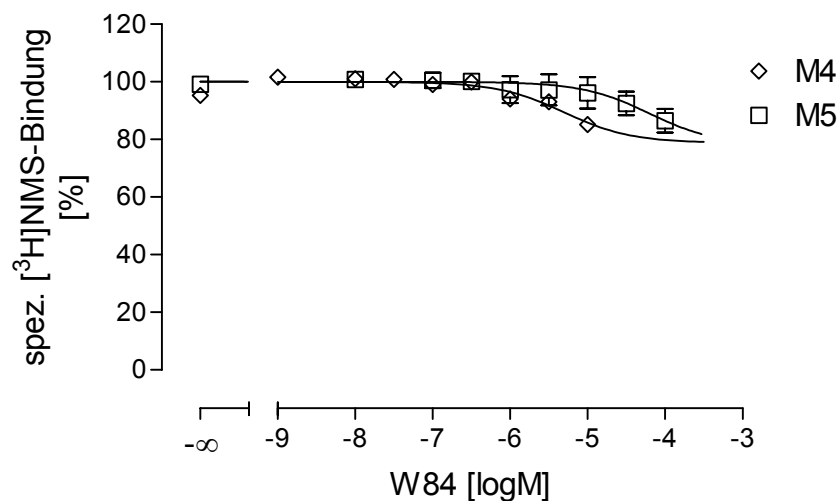


**Abb. 27** Interaktion von W84 mit den fünf [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten muskarinischen Rezeptorsubtypen in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: Geschwindigkeit der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen von W84. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-5 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Die unteren Plateaus der Kurven in Abb. 27 liegen zwischen 15,4 % ( $\text{M}_2$ ) und 21,2 % ( $\text{M}_3$ ) und sind damit signifikant verschieden von Null, was jedoch keinen Einfluss auf die Ermittlung des Affinitätsparameters  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$  hat. Das obere Plateau wurde auf 100% festgesetzt. Die Steigungen aller Kurven wichen nicht signifikant von -1 ab und wurden auf diesen Wert festgesetzt.



**Abb. 28** Einfluss von W84 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den Rezeptorsubtypen  $\text{M}_1$ ,  $\text{M}_2$  und  $\text{M}_3$ . Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von W84. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-11 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Sind die Streuungsbalken nicht zu sehen, liegen sie hinter den Symbolen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug für  $\text{M}_1$ : 6h,  $\text{M}_2$ : 6h,  $\text{M}_3$ : 4h.



**Abb. 29** Einfluss von W84 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den Rezeptorsubtypen  $\text{M}_4$  und  $\text{M}_5$ . Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von W84. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug für  $\text{M}_4$ : 4h, für  $\text{M}_5$ : 4,5h.

Tab. 28 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse zur Substanz W84. Die  $pK_A$ - und  $p\alpha$ -Werte wurden hier, wie in allen folgenden Abschnitten, durch zwei unterschiedliche Auswertungen ermittelt. Zum Einen wurden die Einzelexperimente direkt nach Ehlert analysiert und die so gewonnenen Parameter der Einzelexperimente gemittelt ( $pK_A(\text{direkt})$ ,  $p\alpha(\text{direkt})$ ). Zum Anderen wurden die Daten aus allen Einzelexperimenten zusammengefasst und eine Kurve mittels einer modifizierten Ehlert-Gleichung indirekt unter zu Hilfenahme des gemittelten Parameters  $EC_{0,5\text{diss}}$  angepasst. Hieraus erhält man den Parameter  $pK_A(\text{indirekt})$  mit dessen Hilfe sich auch der Kooperativitätsfaktor  $p\alpha$  berechnen lässt. Da sich der Wert  $p\alpha(\text{indirekt})$  aus der Differenz aus  $pEC_{0,5\text{diss}}$  und  $pK_A$  ergibt, konnte hier keine Streuung angegeben werden (Näheres hierzu siehe Abschnitt 4.2).

	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
$pEC_{0,5\text{diss}}$	$5,51 \pm 0,02$ n = 5	$5,91 \pm 0,09$ n = 5	$4,27 \pm 0,04$ n = 5	$5,20 \pm 0,03$ n = 4	$4,10 \pm 0,05$ n = 5
$p\alpha(\text{direkt})$	n.b.	$-0,45 \pm 0,04$ n = 11	$-0,18 \pm 0,03$ n = 3	n.b.	n.b.
$pK_A(\text{direkt})$	n.b.	$5,49 \pm 0,07$ n = 11	$4,36 \pm 0,10$ n = 3	n.b.	n.b.
$pK_A(\text{indirekt})$	$5,58 \pm 0,01$ n = 7	$6,12 \pm 0,01$ n = 11	$4,43 \pm 0,01$ n = 3	$5,36 \pm 0,02$ n = 3	$4,25 \pm 0,03$ n = 4
$p\alpha(\text{indirekt})$	-0,07	-0,21	-0,16	-0,16	-0,15

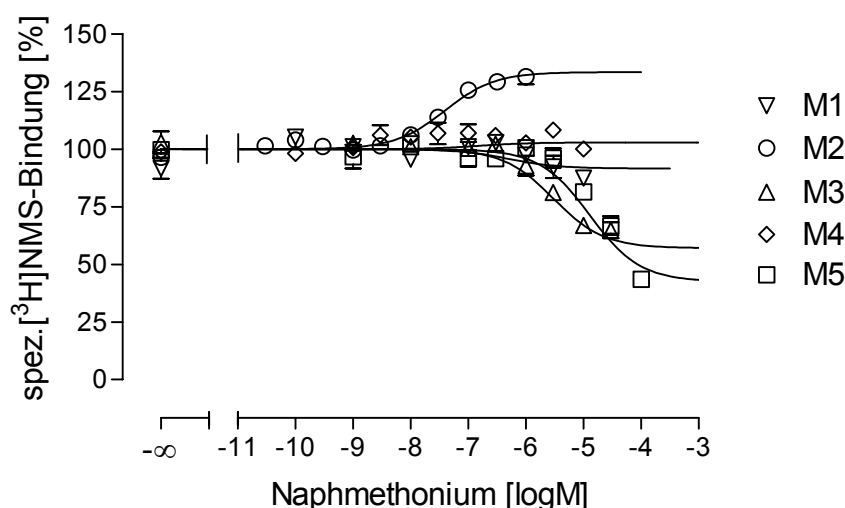
**Tab. 28** Bindungsparameter des Prototyp-Modulators W84 an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. n.b.:  $pK_A$  konnte aus den experimentellen Daten nicht direkt bestimmt werden, da eine Auswertung mit der Gleichung nach Ehlert zu keiner sinnvollen Kurvenanpassung führte. Deswegen musste zur Auswertung eine modifizierte Gleichung nach Ehlert verwendet werden.  $p\alpha(\text{direkt})$  und  $pK_A(\text{direkt})$  entstammen einer direkten Auswertung nach Ehlert.  $p\alpha(\text{indirekt})$  und  $pK_A(\text{indirekt})$  wurden durch indirekte Auswertung nach Ehlert unter Verwendung von  $EC_{0,5\text{diss}}$  ermittelt (siehe Text).

Zur weiteren Diskussion der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden die indirekt bestimmten Parameter  $pK_A$  und  $p\alpha$  verwendet.

Die höchste Affinität zeigt W84 zum M<sub>2</sub>-Rezeptor, die geringste zum M<sub>5</sub>-Rezeptor. Die Spanne der Subtypselektivität erstreckt sich dabei am [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor über ca. 1,8 Dekaden, am freien Rezeptor über ca. 1,9 Dekaden. W84 ist an allen Rezeptorsubtypen negativ kooperativ mit [<sup>3</sup>H]NMS. Das Ausmaß der negativen Kooperativität schwankt von  $p\alpha = -0,21$  (M<sub>2</sub>) bis  $p\alpha = -0,07$  (M<sub>1</sub>).

### 3.4.4 Charakterisierung der Affinität von Naphmethonium zu den muskarinischen Rezeptorsubtypen

Durch Einführung eines Naphthalimidringsystems in die Alkan-Bisammonium-Grundstruktur bei gleichzeitiger Seitenkettenmethylierung erhält man die Substanz Naphmethonium, die in den Versuchen mit Schweineherzhomogenaten die höchste Affinität zusammen mit einer ausgeprägten positiven Kooperativität mit NMS gezeigt hat. Zur Klärung, ob dieser Anstieg der Affinität an allen Rezeptorsubtypen gleich groß ist oder sich auf den M<sub>2</sub>-Subtyp beschränkt und damit zu einer Steigerung der Subtypselektivität führt, wurde die Substanz in kinetischen Versuchen (siehe Abb. 11, Tab. 15) sowie in heterologen Interaktionsexperimenten (Abb. 30), an den fünf muskarinischen Rezeptor-Subtypen untersucht.



**Abb. 30** Einfluss von Naphmethonium auf die Bindung von [<sup>3</sup>H]NMS (0,4 nM) an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate: spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von Naphmethonium. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug für M<sub>1</sub>: 8h, M<sub>2</sub>: 19h, M<sub>3</sub>: 3h, M<sub>4</sub>: 4h, M<sub>5</sub>: 19h.

Tab. 29 zeigt eine Zusammenfassung aller Bindungsparameter von Naphmethonium.

	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
pEC <sub>0,5diss</sub>	6,54 ± 0,03 n = 4	7,95 ± 0,04 n = 4	5,42 ± 0,03 n = 4	6,90 ± 0,07 n = 4	4,59 ± 0,06 n = 4
pα(direkt)	n.b.	0,23 ± 0,01 n = 4	-0,31 ± 0,02 n = 3	n.b.	-0,53 ± 0,05 n = 4
pK <sub>A</sub> (direkt)	n.b.	7,29 ± 0,06 n = 4	5,58 ± 0,14 n = 3	n.b.	4,62 ± 0,10 n = 4
pK <sub>A</sub> (indirekt)	6,59 ± 0,02 n = 4	7,76 ± 0,01 n = 4	5,68 ± 0,02 n = 3	6,86 ± 0,01 n = 5	5,06 ± 0,03 n = 4
pα(indirekt)	-0,05	0,19	-0,26	0,04	-0,47

**Tab. 29** Bindungsparameter von Naphmethonium an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. n.b.: pK<sub>A</sub> konnte wegen nahezu neutraler Kooperativität aus den experimentellen Daten nicht direkt bestimmt werden. Deswegen musste zur Auswertung die modifizierte Gleichung nach Ehlert verwendet werden. Abkürzungen wie in Legende zu Tab. 28 erklärt.

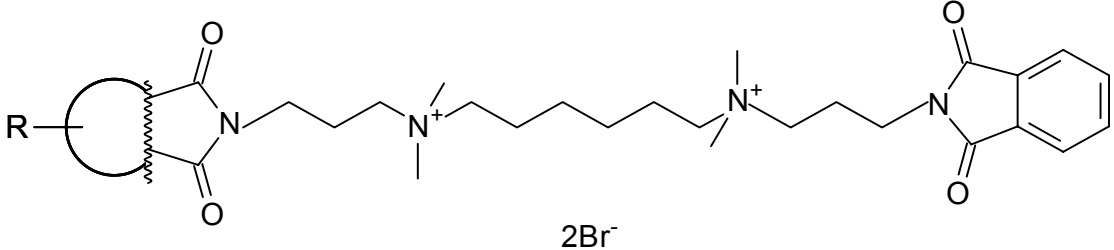
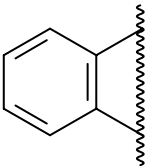
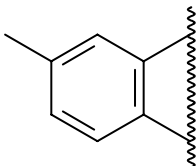
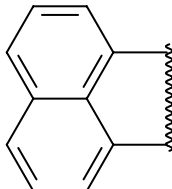
Wie Abb. 30 mit den Konzentrations-Effekt-Kurven der heterologen Interaktionsversuche zeigt, führt Naphmethonium nur am M<sub>2</sub>-Rezeptor zu einer Bindungsförderung von [<sup>3</sup>H]NMS. An den Subtypen M<sub>4</sub> und M<sub>1</sub> zeigt es neutrale und an M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> negative Kooperativität. Am M<sub>2</sub>-Rezeptor wurde über eine Zeit von 19 Stunden inkubiert, da zur ausreichenden Beschreibung des oberen Plateaus der Einsatz höherer Alloster-Konzentrationen nötig war und somit die Einstellung des Bindungsgleichgewichts eine längere Inkubationszeit erforderte (siehe Gleichung 12).

Die Reihenfolge der Affinitäten zu den freien Rezeptoren ist die gleiche wie die zu den [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren: M<sub>2</sub> > M<sub>4</sub> > M<sub>1</sub> > M<sub>3</sub> > M<sub>5</sub>. Die Spanne der M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Subtypselektivität ist am freien Rezeptor mit 2,7 log Einheiten allerdings geringer als am besetzten Rezeptor (ΔpEC<sub>0,5diss</sub> = 3,4).

### 3.4.5 Einfluss der Variation des lateralen Ringsystems auf das Muster der Subtypselektivität von W84-Derivaten ohne Seitenkettenmethylierung

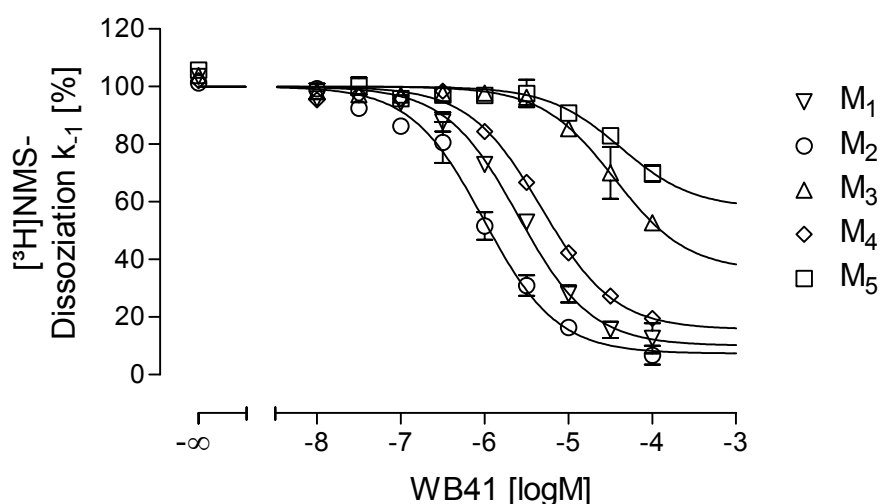
Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Subtypselektivität von Naphmethonium an den fünf muskarinischen Rezeptoren haben gezeigt, dass durch strukturelle Veränderungen des W84-Gerüsts nicht nur die Affinität gesteigert werden kann,

sondern auch die Subtypselektivität der modifizierten Verbindung verbessert wurde. Um zu klären, welche strukturellen Veränderungen diese gesteigerte Subtypselektivität hervorrufen, wurden in einer ersten Versuchsreihe Substanzen untersucht, welche im Vergleich zur Leitsubstanz W84 ein verändertes laterales Ringsystem aufweisen, jedoch an den Seitenketten des Moleküls nicht substituiert sind. Tab. 30 gibt einen Überblick über die Strukturformeln der untersuchten Substanzen.

 <p style="text-align: center;">2Br<sup>-</sup></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Phth</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Mephth</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Naphth</p> </div> </div>	
	R
W84	Phth
WB41	Mephth
WB37	Naphth

**Tab. 30** Strukturformeln der untersuchten Alkan-Bisammonium-Verbindungen

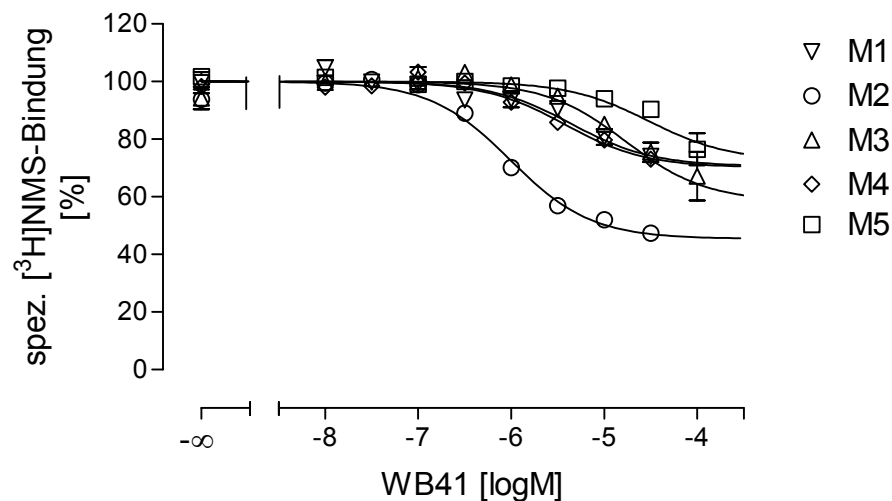
Die Ergebnisse aus [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationsexperimenten und heterologen Interaktionsexperimenten sind in Abb. 31 bis Abb. 34 aufgeführt.



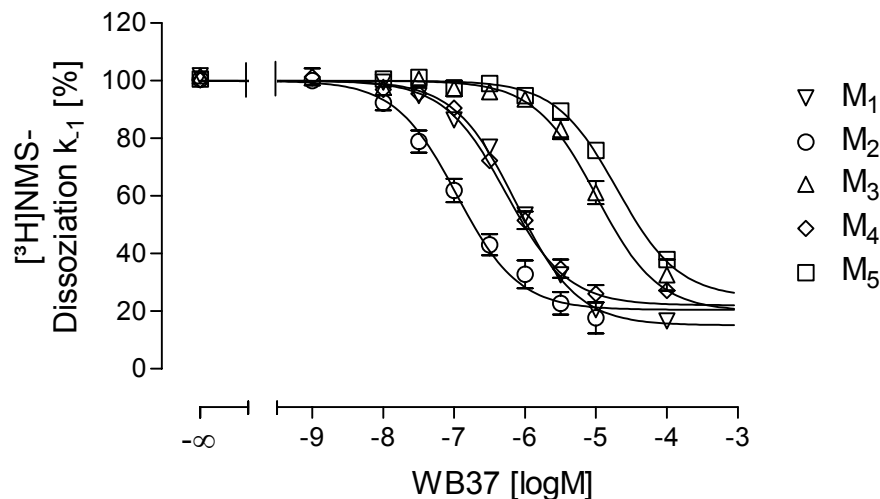
**Abb. 31** Interaktion von WB41 mit den fünf  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten muskarinischen Rezeptorsubtypen in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: Geschwindigkeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen von W84. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-4 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Das obere Plateau der Kurven wurde auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven an den Subtypen  $M_1$ - $M_3$  liegen zwischen 7,3 und 15,7 % und sind signifikant unterschiedlich von Null. Einen noch schwächeren maximalen dissoziationsverzögernden Effekt beobachtet man an den Rezeptorsubtypen  $M_3$  und  $M_5$ , die sich durch eine langsame Kinetik auszeichnen. Hier erreichen die unteren Plateaus lediglich 36,1 % ( $M_3$ ) bzw. 57,8 % ( $M_5$ ), was jedoch die Bestimmung von  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$  nicht beeinflusst. Der Einsatz von höheren Konzentrationen des Allostere zur genaueren Beschreibung der unteren Plateaus wurde durch die Löslichkeit bzw. durch die zur Verfügung stehende Menge der Substanz limitiert. Die Steigungen der Kurven sind nicht signifikant verschieden von  $-1$ .



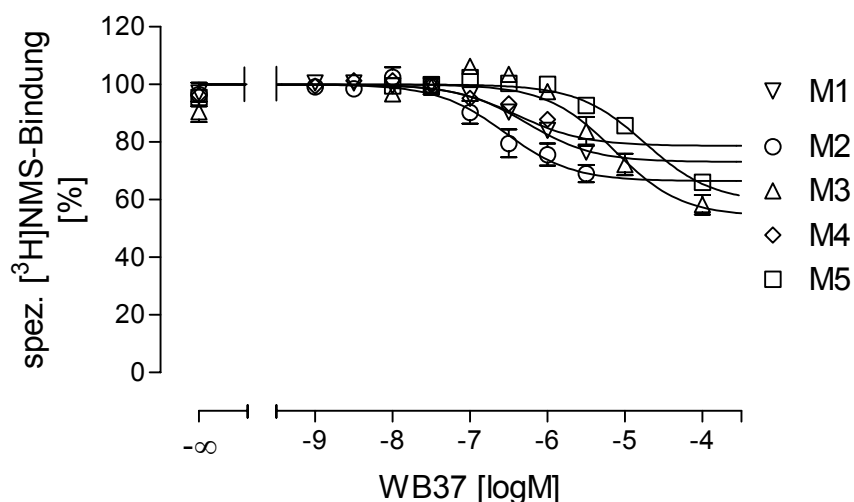


**Abb. 32** Einfluss von WB41 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von WB41. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug 5 Stunden.



**Abb. 33** Interaktion von WB37 mit den fünf  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten muskarinischen Rezeptorsubtypen in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: Geschwindigkeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen von WB37. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-6 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Die unteren Plateaus der Kurven sind signifikant verschieden von Null und liegen zwischen 15,1 und 24,8 %. Das obere Plateau wurde jeweils auf 100 % festgesetzt. Die Steigungen der Kurven sind nicht signifikant verschieden von  $-1$ .



**Abb. 34** Einfluss von WB37 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von WB37. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug 5 Stunden.

Die Tab. 31 bis Tab. 33 fassen die aus den dargestellten Kurven gewonnenen Parameter zusammen.

Substanz	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
WB41	5,60 $\pm$ 0,05 n = 4	6,01 $\pm$ 0,06 n = 6	4,45 $\pm$ 0,10 n = 4	5,32 $\pm$ 0,03 n = 4	4,38 $\pm$ 0,18 n = 3
WB37	6,13 $\pm$ 0,03 n = 4	6,96 $\pm$ 0,07 n = 6	5,00 $\pm$ 0,09 n = 4	6,27 $\pm$ 0,06 n = 4	4,70 $\pm$ 0,07 n = 4

**Tab. 31**  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

Substanz		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
WB41	indirekt	-0,16	-0,37	-0,25	-0,23	-0,19
	direkt	-0,21 ± 0,04 n = 3	-0,44 ± 0,03 n = 4	-0,26 ± 0,08 n = 3	-0,23 ± 0,03 n = 3	-0,20 ± 0,05 n = 3
WB37	indirekt	-0,17	-0,22	-0,26	-0,12	-0,25
	direkt	-0,18 ± 0,03 n = 5	-0,29 ± 0,02 n = 3	-0,28 ± 0,03 n = 3	-0,15 ± 0,03 n = 5	-0,29 ± 0,02 n = 4

**Tab. 32**  $p\alpha$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt mit der nicht modifizierten Gleichung nach Ehlert (direkt), dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, bzw. berechnet, nach Analyse der Daten mit der modifizierten Ehlert-Gleichung zur Ermittlung von  $K_A$  (indirekt). Dargestellt sind hier die berechneten Werte aus  $pEC_{0,5diss}-pK_A$ .

Substanz		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
WB41	indirekt	5,76 ± 0,01 n = 3	6,38 ± 0,01 n = 4	4,70 ± 0,02 n = 3	5,55 ± 0,01 n = 3	4,57 ± 0,02 n = 3
	direkt	5,41 ± 0,16 n = 3	6,10 ± 0,04 n = 4	4,79 ± 0,11 n = 3	5,50 ± 0,07 n = 3	4,03 ± 0,12 n = 3
WB37	indirekt	6,30 ± 0,01 n = 5	7,18 ± 0,02 n = 3	5,26 ± 0,02 n = 3	6,39 ± 0,01 n = 5	4,95 ± 0,01 n = 4
	direkt	6,25 ± 0,08 n = 5	6,66 ± 0,11 n = 3	5,16 ± 0,09 n = 3	6,39 ± 0,30 n = 5	4,80 ± 0,09 n = 4

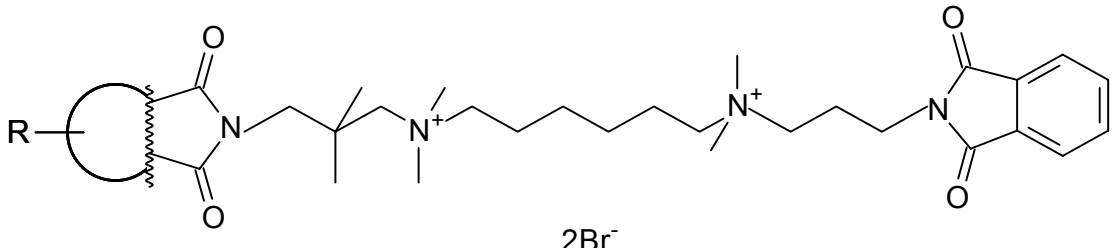
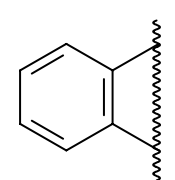
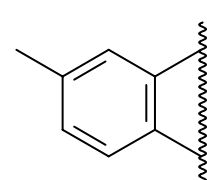
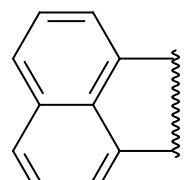
**Tab. 33**  $pK_A$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung durch Ersatz von  $\alpha$  durch  $EC_{0,5diss}/K_A$  (indirekt) bzw. mit der nicht modifizierten Gleichung nach Ehlert (direkt). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

Sowohl am [ $^3H$ ]NMS-besetzten ( $pEC_{0,5diss}$ -Werte) als auch am freien Rezeptor ( $pK_A$ -Werte) weisen die Substanzen WB41 und WB37 jeweils die höchste Affinität zum Subtyp M<sub>2</sub> und die niedrigsten Affinitäten zu den Subtypen M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> auf. Auf M<sub>2</sub> folgen bei der Substanz WB41 die Subtypen M<sub>1</sub> sowie M<sub>4</sub>. Die Verbindung WB37 zeigt jeweils die zweithöchste Affinität zum Subtyp M<sub>4</sub> gefolgt von M<sub>1</sub>, wobei sich jedoch am Orthoster-besetzten Rezeptor die Affinitäten nicht signifikant von einander unterscheiden ( $p > 0,05$ ). Beide Substanzen führen an allen fünf Rezeptorsubtypen zu einer Verminderung der [ $^3H$ ]NMS-Gleichgewichtsbindung. Die Kooperativitätsfaktoren ( $p\alpha$ ) erstrecken sich bei der Substanz WB41 über einen Bereich von -0,16 bis -0,37, bei WB37 über einen Bereich von -0,12 bis -0,25.

### 3.4.6 Einfluss der Variation des lateralen Ringsystems auf das Muster der Subtypselektivität von W84-Derivaten mit Seitenkettenmethylierung

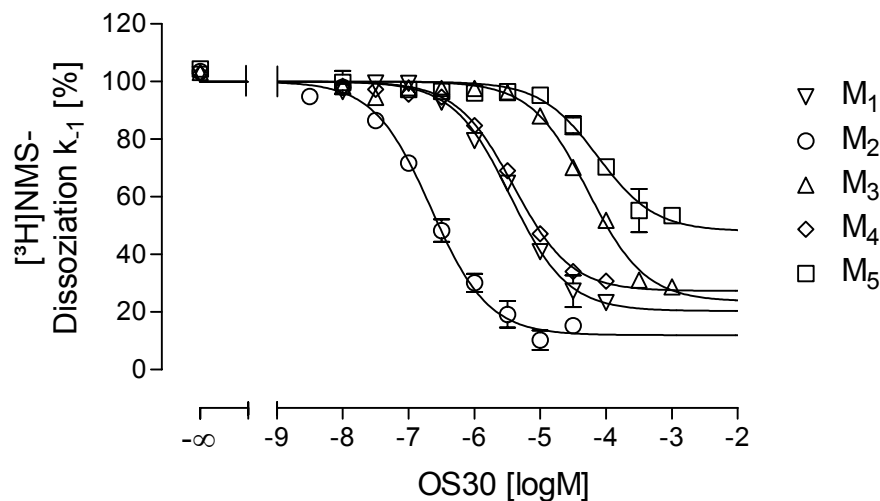
Neben den unter 3.4.5 aufgeführten Substanzen wurden zur Komplettierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen W84-Derivate an den fünf muskarinischen Rezeptor-subtypen untersucht, bei denen eine Dimethylierung der Seitenkette sowie Veränderungen des lateralen Ringsystems vorgenommen wurden.

Die Strukturformeln der untersuchten Substanzen sind in Tab. 34 dargestellt.

 <p style="text-align: center;">2Br<sup>-</sup></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  Phth         </div> <div style="text-align: center;">  Mephth         </div> <div style="text-align: center;">  Naphth         </div> </div>	
	R
OS30	Phth
OS72	Mephth
Naphmethonium	Naphth

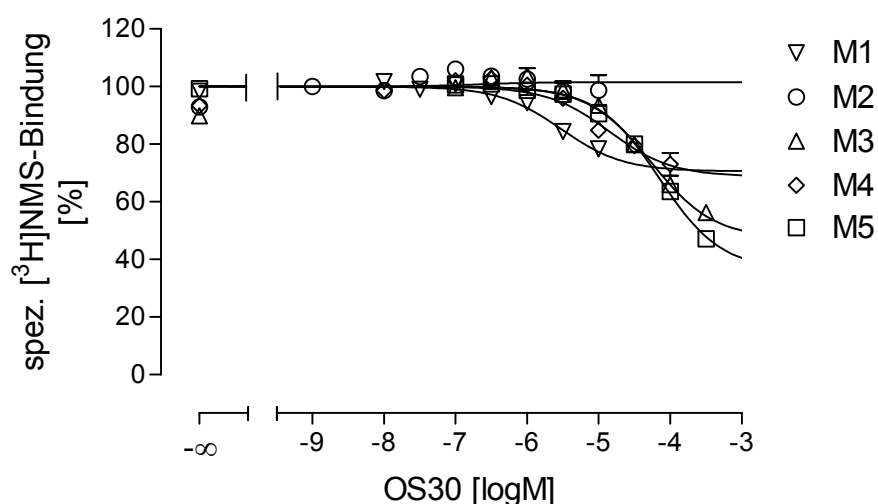
**Tab. 34** Strukturformeln der untersuchten Alkan-Bisammonium-Verbindungen

Die Ergebnisse aus Dissoziationsversuchen und heterologen Interaktionsexperimenten sind in den Abb. 35 bis Abb. 38 dargestellt.

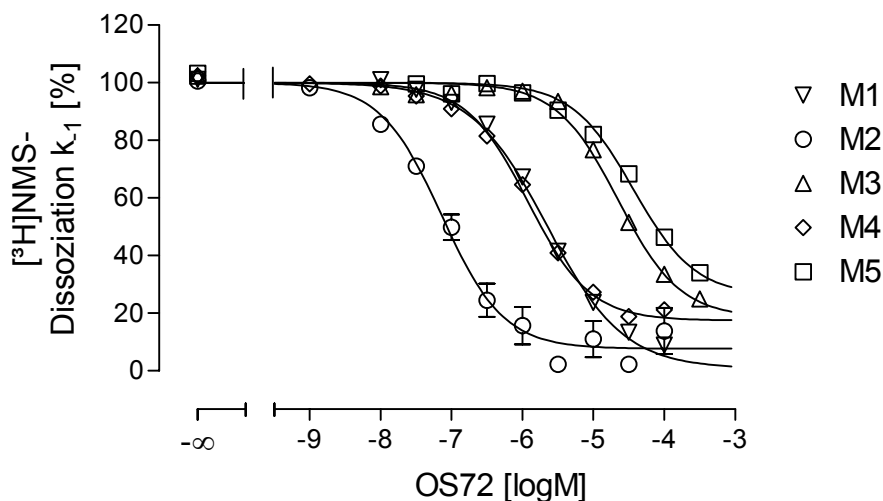


**Abb. 35** Interaktion von OS30 mit den fünf [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten muskarinischen Rezeptorsubtypen in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: Geschwindigkeit der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen von W84. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-6 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Alle in Abb. 35 gezeigten Kurven besitzen eine Steigung, die nicht signifikant verschieden von  $-1$  ist. Das obere Plateau wurde jeweils auf 100% festgesetzt. Die Dissoziationsgeschwindigkeit konnte mittels OS30 an den Subtypen  $\text{M}_1$ - $\text{M}_4$  maximal auf Werte zwischen 12,0 und 27,3 % gesenkt werden, an  $\text{M}_5$  sogar nur auf 48,1 %, was jedoch keinen Einfluss auf die Erhebung des Affinitätsparameters  $\text{EC}_{0,5\text{diss}}$  hatte.

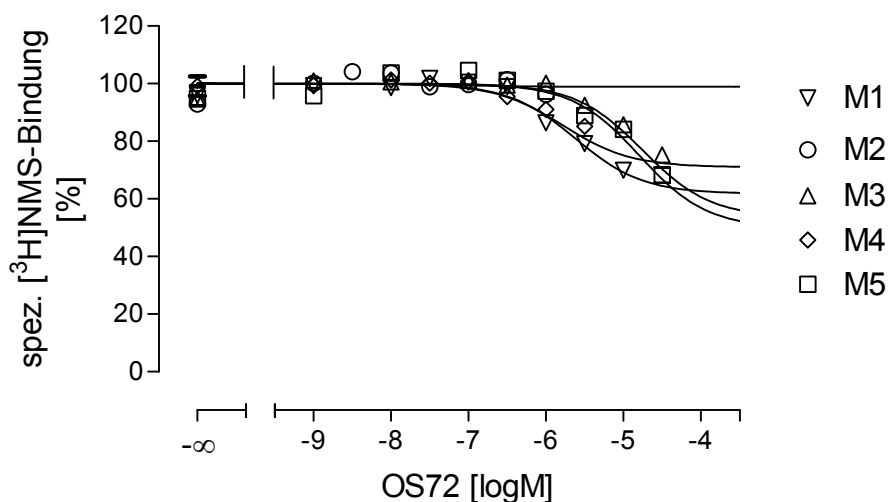


**Abb. 36** Einfluss von OS30 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von OS30. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug für  $M_1$ : 4h,  $M_2$ : 6h,  $M_3$ : 4h,  $M_4$ : 5h,  $M_5$ : 6h..



**Abb. 37** Interaktion von OS72 mit den fünf  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten muskarinischen Rezeptorsubtypen in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: Geschwindigkeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_1$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen von W84. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 6 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-6 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Alle Konzentrations-Effekt-Kurven von OS72 besitzen eine Steigung von  $-1$ . Das obere Plateau der Kurven wurde auf den Wert 100 % festgesetzt. Die unteren Plateaus der Kurven (maximaler dissoziationsverzögernder Effekt) sind signifikant verschieden von Null und liegen bei Werten zwischen 3,1 und 26,1 %.



**Abb. 38** Einfluss von OS72 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von OS72. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug für M<sub>1</sub>: 4h, M<sub>2</sub>: 4h, M<sub>3</sub>: 3h, M<sub>4</sub>: 4,5h, M<sub>5</sub>: 4h..

Die Tab. 35 bis Tab. 37 geben eine Übersicht über die aus den Kurven gewonnenen Bindungsparameter.

Substanz	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
OS30	5,45 $\pm$ 0,03 n = 4	6,66 $\pm$ 0,05 n = 6	4,27 $\pm$ 0,04 n = 6	5,40 $\pm$ 0,03 n = 4	4,13 $\pm$ 0,08 n = 4
OS72	5,61 $\pm$ 0,05 n = 6	7,14 $\pm$ 0,07 n = 6	4,65 $\pm$ 0,03 n = 6	5,92 $\pm$ 0,02 n = 6	4,44 $\pm$ 0,04 n = 6

**Tab. 35**  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

Substanz		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
OS30	indirekt	-0,19	0,01	-0,27	-0,16	-0,41
	direkt	-0,20 ± 0,03 n = 4	n.b.	-0,35 ± 0,03 n = 4	-0,24 ± 0,02 n = 9	-0,56 ± 0,03 n = 4
OS72	indirekt	-0,25	-0,01	-0,21	-0,14	-0,39
	direkt	-0,29 ± 0,02 n = 4	n.b.	-0,29 ± 0,08 n = 4	-0,23 ± 0,09 n = 3	-0,39 ± 0,08 n = 4

**Tab. 36**  $p\alpha$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt mit der nicht modifizierten Gleichung nach Ehlert (direkt), dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, bzw. berechnet, nach Analyse der Daten mit der modifizierten Ehlert-Gleichung zur Ermittlung von  $K_A$  (indirekt). Dargestellt sind hier die berechneten Werte aus  $pEC_{0,5diss}-pK_A$ . n.b.:  $p\alpha$  konnte aus den experimentellen Daten nicht direkt bestimmt werden, da eine Auswertung mit der Gleichung nach Ehlert zu keiner sinnvollen Kurvenanpassung führte. Deswegen musste zur Auswertung die modifizierte Gleichung nach Ehlert verwendet werden.

Substanz		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
OS30	indirekt	5,64 ± 0,01 n = 4	6,65 ± 0,01 n = 5	4,54 ± 0,01 n = 4	5,56 ± 0,01 n = 9	4,54 ± 0,01 n = 4
	direkt	5,58 ± 0,08 n = 4	n.b.	4,29 ± 0,10 n = 4	5,25 ± 0,23 n = 3	4,26 ± 0,04 n = 4
OS72	indirekt	5,86 ± 0,01 n = 4	7,15 ± 0,01 n = 4	4,86 ± 0,01 n = 4	6,06 ± 0,01 n = 3	4,83 ± 0,02 n = 4
	direkt	5,70 ± 0,11 n = 4	n.b.	4,77 ± 0,22 n = 4	5,85 ± 0,23 n = 3	4,88 ± 0,08 n = 4

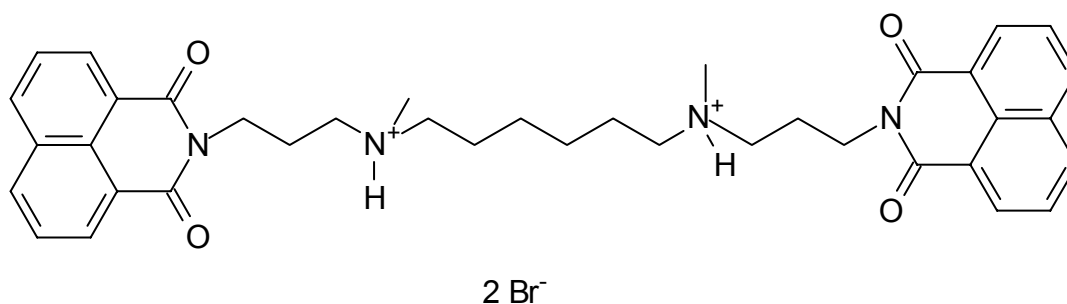
**Tab. 37**  $pK_A$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung durch Ersatz von  $\alpha$  durch  $EC_{0,5diss}/K_A$  (indirekt) bzw. mit der nicht modifizierten Gleichung nach Ehlert (direkt). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n.b.:  $pK_A$  konnte aus den experimentellen Daten nicht direkt bestimmt werden, da eine Auswertung mit der Gleichung nach Ehlert zu keiner sinnvollen Kurvenanpassung führte. Deswegen musste zur Auswertung die modifizierte Gleichung nach Ehlert verwendet werden.

Die Verbindungen OS30 und OS72 zeigen sowohl am Orthoster-besetzten als auch am freien Rezeptor die höchste Affinität zum Subtyp M<sub>2</sub>. Bei OS30 folgen in der Reihenfolge der Affinitäten jeweils M<sub>1</sub>  $\cong$  M<sub>4</sub> > M<sub>3</sub>  $\cong$  M<sub>5</sub>. Die Substanz OS72 zeigt eine eindeutige Rangfolge der Affinitäten an den einzelnen Subtypen mit der Reihenfolge M<sub>4</sub> > M<sub>1</sub> > M<sub>3</sub> > M<sub>5</sub>. Beide Substanzen interagieren jeweils nur am Rezeptorsubtyp M<sub>2</sub> neutral kooperativ mit [<sup>3</sup>H]NMS. An den restlichen vier Subtypen zeigen sie negative Kooperativität ( $p\alpha < 0$ ), wobei diese jeweils am Subtyp M<sub>5</sub> deutlich am stärksten ausgeprägt ist.



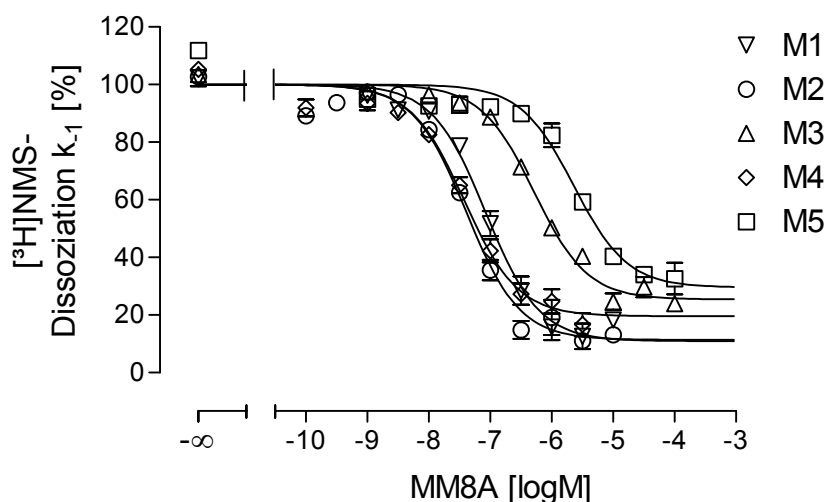
### 3.4.7 Charakterisierung der Affinität eines tertiären Alkan-Bisammonium-Derivats zu den muskarinischen Rezeptorsubtypen

Neben den bisher besprochenen quartären Alkan-Bisammonium-Verbindungen wurde des weiteren die bistertiäre Verbindung MM8A (Abb. 39) hinsichtlich ihrer Affinität zu den fünf muskarinischen Rezeptoren untersucht. Zum Vergleich wurde die Affinität des bisquartären Analogons zu MM8A (WB64 ) ermittelt.



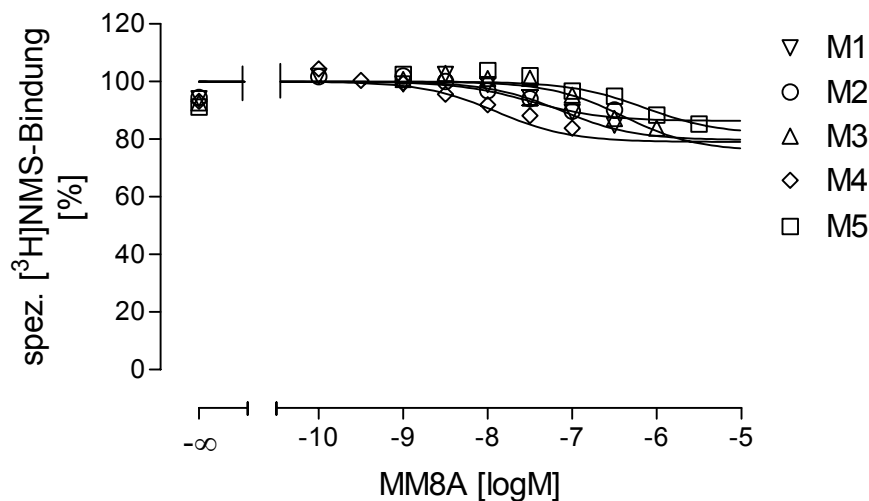
**Abb. 39** Strukturformel des tertiären W84-Derivats MM8A

Die Ergebnisse aus [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationsexperimenten und heterologen Interaktionsversuchen sind in Abb. 40 bis Abb. 43 dargestellt.

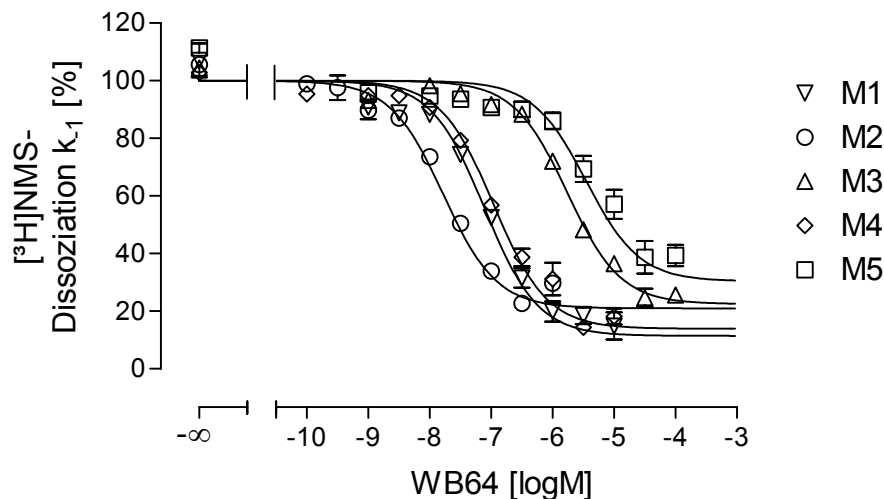


**Abb. 40** Interaktion von MM8A mit den fünf [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten muskarinischen Rezeptorsubtypen in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: Geschwindigkeit der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen von MM8A. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-6 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Die unteren Plateaus der Kurven aus Abb. 40 liegen zwischen 11,0 und 29,6 % und unterscheiden sich signifikant von Null, was jedoch keinen Einfluss auf die Ermittlung des Affinitätsparameters  $\text{EC}_{0,5\text{diss}}$  hat. Die oberen Plateaus unterscheiden sich nicht signifikant von 100% und wurden somit auf diesen Wert festgesetzt. Die Kurven konnten mit einer Steilheit von  $-1$  angepasst werden, da sich auch hier kein signifikanter Unterschied ergab.

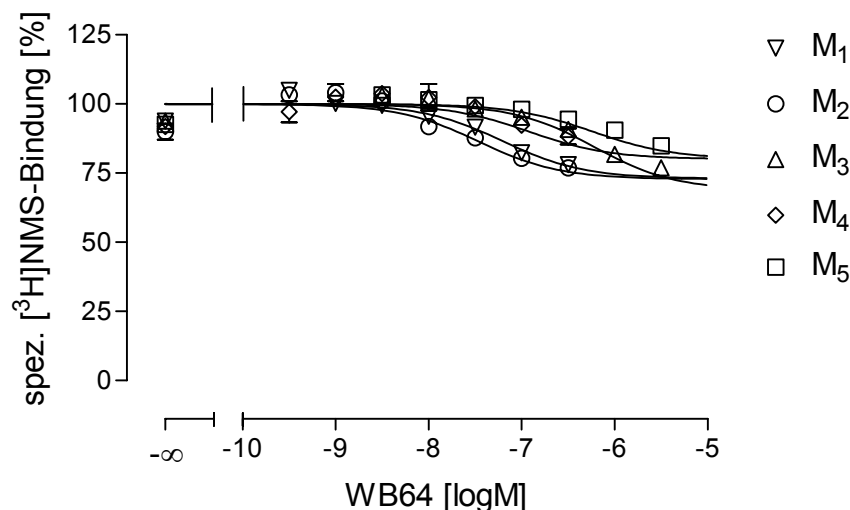


**Abb. 41** Einfluss von MM8A auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von MM8A. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug 5 Stunden.



**Abb. 42** Interaktion von WB64 mit den fünf  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten muskarinischen Rezeptorsubtypen in Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Ordinate: Geschwindigkeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentrationen von WB64. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung, wobei für die einzelnen Konzentrationen 2-6 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4.

Alle Kurven aus Abb. 42 konnten mit der Steigung  $n = -1$  angepasst werden. Die oberen Plateaus unterscheiden sich nicht signifikant von 100% und wurden auf diesen Wert festgesetzt. Die unteren Plateaus der Kurven sind signifikant verschieden von 0 und liegen bei Werten zwischen 11,4 und 30,4 %.



**Abb. 43** Einfluss von WB64 auf die Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  (0,4 nM) an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von WB64. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Kurvenanpassung: Gleichung 11. Die Inkubationszeit betrug 5 Stunden.

Eine Übersicht über die ermittelten Kenngrößen von WB64 an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen wird in Tab. 38 bis Tab. 40 gegeben.

Substanz	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
WB64	7,07 $\pm$ 0,05 n = 4	7,39 $\pm$ 0,05 n = 6	6,28 $\pm$ 0,04 n = 6	7,42 $\pm$ 0,06 n = 4	5,64 $\pm$ 0,09 n = 4
MM8A	7,11 $\pm$ 0,07 n = 4	7,78 $\pm$ 0,06 n = 6	5,76 $\pm$ 0,05 n = 4	6,96 $\pm$ 0,06 n = 4	5,45 $\pm$ 0,11 n = 6

**Tab. 38**  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

Substanz		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
MM8A	indirekt	-0,12	-0,08	-0,13	-0,17	-0,18
	direkt	-0,14 ± 0,03 n = 5	-0,09 ± 0,01 n = 6	-0,13 ± 0,01 n = 3	-0,16 ± 0,03 n = 5	-0,13 ± 0,02 n = 3
WB64	indirekt	-0,18	-0,15	-0,20	-0,09	-0,20
	direkt	-0,19 ± 0,01 n = 3	-0,20 ± 0,03 n = 4	-0,18 ± 0,03 n = 5	-0,15 ± 0,06 n = 3	-0,14 ± 0,03 n = 5

**Tab. 39**  $p\alpha$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt mit der nicht modifizierten Gleichung nach Ehlert (direkt), dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, bzw. berechnet, nach Analyse der Daten mit der modifizierten Ehlert-Gleichung zur Ermittlung von  $K_A$  (indirekt). Dargestellt sind hier die berechneten Werte aus  $pEC_{0,5diss}-pK_A$ .

Substanz		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
MM8A	indirekt	7,19 ± 0,01 n = 5	7,47 ± 0,01 n = 6	6,41 ± 0,01 n = 3	7,59 ± 0,01 n = 5	5,82 ± 0,02 n = 3
	direkt	7,17 ± 0,20 n = 5	7,53 ± 0,26 n = 6	6,41 ± 0,10 n = 3	7,95 ± 0,29 n = 5	6,19 ± 0,12 n = 3
WB64	indirekt	7,32 ± 0,01 n = 3	7,93 ± 0,01 n = 4	5,98 ± 0,01 n = 5	7,14 ± 0,02 n = 3	5,68 ± 0,02 n = 5
	direkt	7,25 ± 0,10 n = 3	7,52 ± 0,16 n = 4	6,23 ± 0,22 n = 5	6,98 ± 0,38 n = 3	6,28 ± 0,33 n = 5

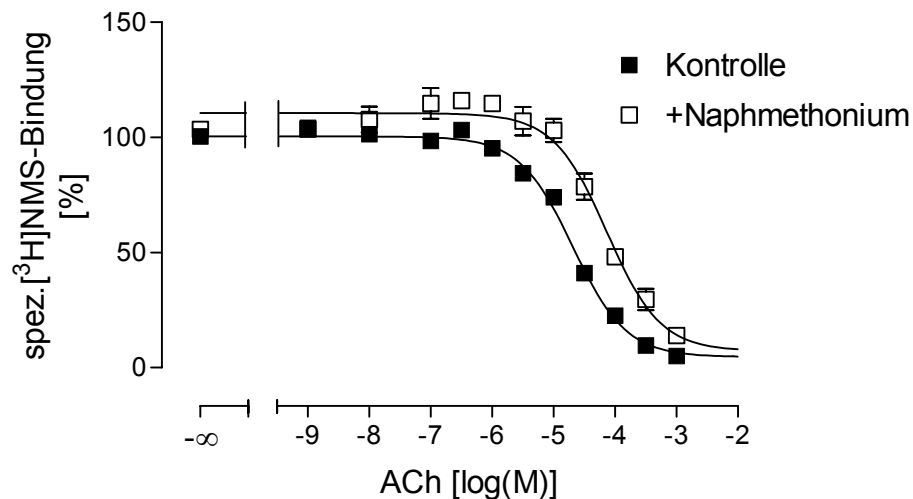
**Tab. 40**  $pK_A$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung durch Ersatz von  $\alpha$  durch  $EC_{0,5diss}/K_A$  (indirekt) bzw. mit der nicht modifizierten Gleichung nach Ehlert (direkt). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

Die tertiäre Verbindung MM8A zeigt eine verhältnismäßig hohe Affinität zum Subtyp M<sub>4</sub>. Am NMS-besetzten Rezeptor ist diese nicht signifikant verschieden von der Affinität zu M<sub>2</sub>, am freien Rezeptor sogar signifikant höher. In der weitere Reihenfolge liegen die Affinitäten zu M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub>. Das quartäre Analogon WB64 zeigt jeweils die höchste Affinität zu M<sub>2</sub> gefolgt von M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub>. Beide Substanzen führen an jedem Rezeptorsubtyp zu einer leichten Absenkung der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung.

### ***3.5 Modulation der Bindung von Acetylcholin an die muskarinischen Rezeptorsubtypen***

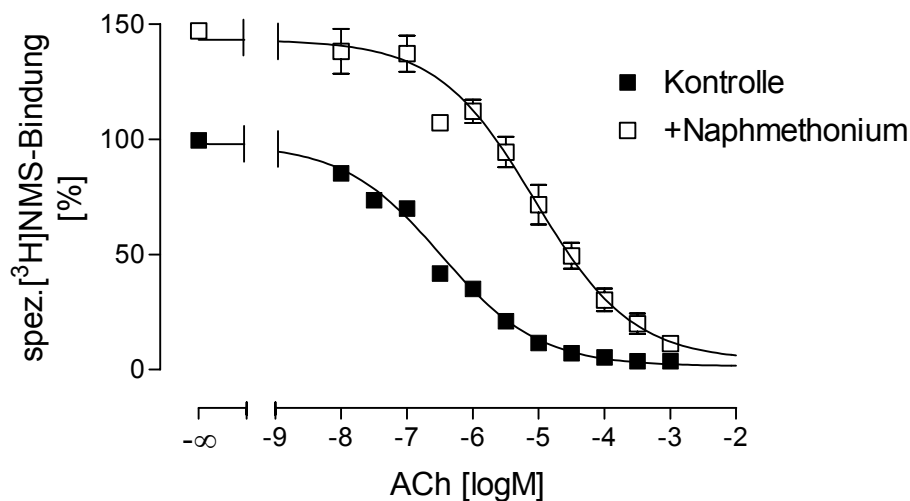
Die Befunde aus 3.4.4, 3.4.5 und 3.4.6 haben gezeigt, dass Naphmethonium die einzige Substanz der Versuchsreihe war, welche die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]NMS am  $\text{M}_2$ -Rezeptor steigern konnte und gleichzeitig die Bindung am  $\text{M}_1$ - und  $\text{M}_4$ -Subtyp relativ unbeeinflusst ließ. Um zu prüfen, ob sich dieses interessante Interaktionsprofil auch auf den physiologischen Agonisten Acetylcholin übertragen lässt, wurden im Folgenden heterologe Interaktionsexperimente mit [ $^3\text{H}$ ]NMS und steigenden Konzentrationen Acetylcholin in An- und Abwesenheit einer bestimmten Konzentration Naphmethonium gemäß 2.3.4 durchgeführt. Die Naphmethonium-Konzentration wurden dabei so gewählt, dass sie sich im Bereich des Maximaleffekts der Substanz in heterologen Interaktionsexperimenten mit [ $^3\text{H}$ ]NMS (siehe Abb. 30) am entsprechenden Rezeptorsubtyp befindet und gleichzeitig die nach Gleichung 13 berechnete Inkubationszeit einen Wert von 6 Stunden nicht überschreitet. Der Einsatz von Cholinesterase-Inhibitoren war nicht notwendig, da CHO-Zellen keine Cholinesterase-Aktivität aufweisen [66, 67].

Abb. 44 bis Abb. 48 zeigen die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen.



**Abb. 44** Inhibition der Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  ( $0,4 \text{ nM}$ ) durch Acetylcholin (ACh) in An- und Abwesenheit (Kontrolle) von Naphmethonium ( $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) am muskarinischen  $\text{M}_1$ -Rezeptor (Homogenat vom 03.05.04). Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit von Acetylcholin und Naphmethonium. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von Acetylcholin. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. aus 3 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4. Die Inkubationszeit betrug 4,5 Stunden

In einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  führt Naphmethonium zu einer leichten jedoch signifikanten Anhebung der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung am  $\text{M}_1$ -Rezeptor (oberes Plateau der Allosterkurve bei  $110 \pm 2 \%$ ). Das Steigungsmass  $n$  ist bei beiden Kurven nicht signifikant verschieden von  $-1$  ( $n(\text{Kontrolle}) = -1,11 \pm 0,20$ ;  $n(\text{Naphmethonium}) = -1,24 \pm 0,15$ ). Zur graphischen Zusammenfassung mehrerer Einzelexperimente wurden die Datenpunkte der verwendeten Konzentrationen vereinigt und die Gesamtkurven anhand der gemittelten Wendepunkte und Steilheitsmaße (hier  $n = -1$ ) aus den Kurven der Einzelexperimente generiert.

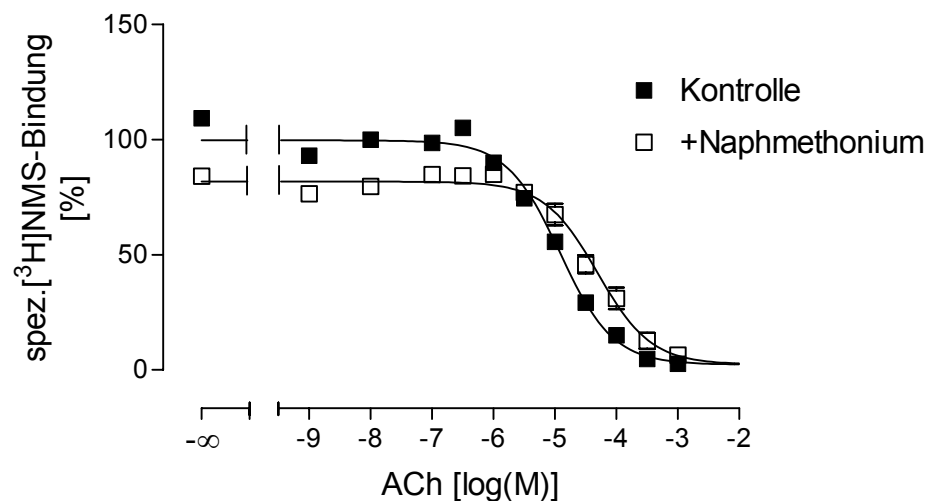


**Abb. 45** Inhibition der Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  ( $0,4 \text{ nM}$ ) durch Acetylcholin (ACh) in An- und Abwesenheit (Kontrolle) von Naphmethonium ( $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) am muskarinischen  $\text{M}_2$ -Rezeptor (Homogenat vom 19.04.05). Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit von Acetylcholin und Naphmethonium. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von Acetylcholin. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4. Die Inkubationszeit betrug 5,5 Stunden.

Die Zugabe von Naphmethonium in einer Konzentration von  $3 \times 10^{-7} \text{ M}$  erhöht die Gesamtbindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  am Rezeptorsubtyp  $\text{M}_2$ . Die Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve startet somit von einem höheren Niveau (oberes Plateau bei  $143 \pm 3 \%$ ) als die Kontrollkurve. Am  $\text{M}_2$ -Subtyp wurde in allen Einzelexperimenten sowohl für die Kontrollkurve als auch für die Alloster-Kurve eine signifikant flachere Steigung als  $-1$  erhalten ( $n(\text{Kontrolle}) = -0,65 \pm 0,07$ ;  $n(\text{Naphmethonium}) = -0,54 \pm 0,06$ ). Dieser flache Kurvenverlauf ist auf den Umstand zurückzuführen, dass Agonsiten zwischen hoch- und niedrigaffinen Rezeptorfraktionen, je nach Kopplungszustand des Rezeptors, unterscheiden können. Diese Tatsache ist bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben [50]. Die Steigungen von Kontroll- und Alloster-Kurve unterscheiden sich nicht signifikant von einander. Für die weitere Auswertung der Kurvenverschiebung nach Arunlakshana und Schild [60] (siehe unten) wird eine gemeinsame Steigung von Kontroll- und Alloster-Kurve vorausgesetzt. Da sich die Steigungen von Kontroll- und Allosterkurve in den Einzelexperimenten ebenfalls nicht signifikant voneinander unterschieden, wurde hier

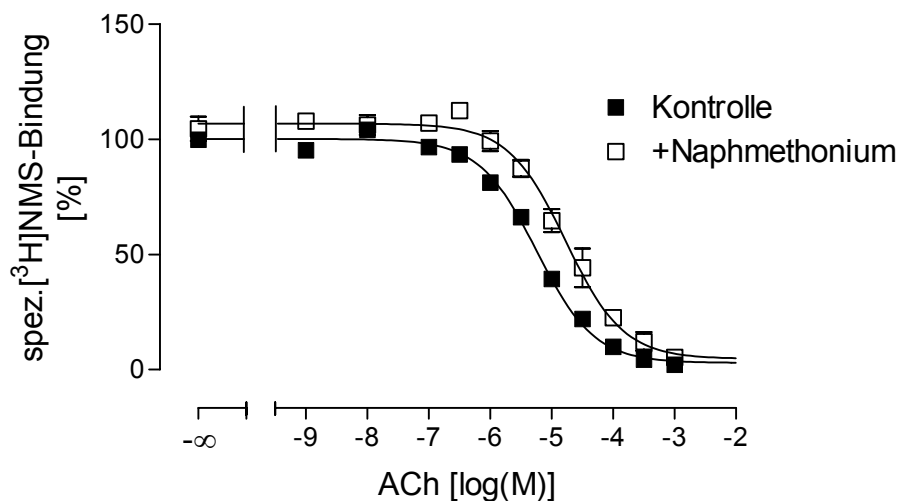


durch das Auswertungsprogramm PRISM® für jedes Experiment eine gemeinsame Steigung errechnet. Zur Zusammenfassung der Einzelexperimente wurden die Steigungen gemittelt und die Gesamtkurven mit Hilfe der gemittelten, konstant gesetzten Steigung ( $n = -0,59 \pm 0,06$ ) und der gemittelten Wendepunkte (siehe Tab. 41) angepasst.



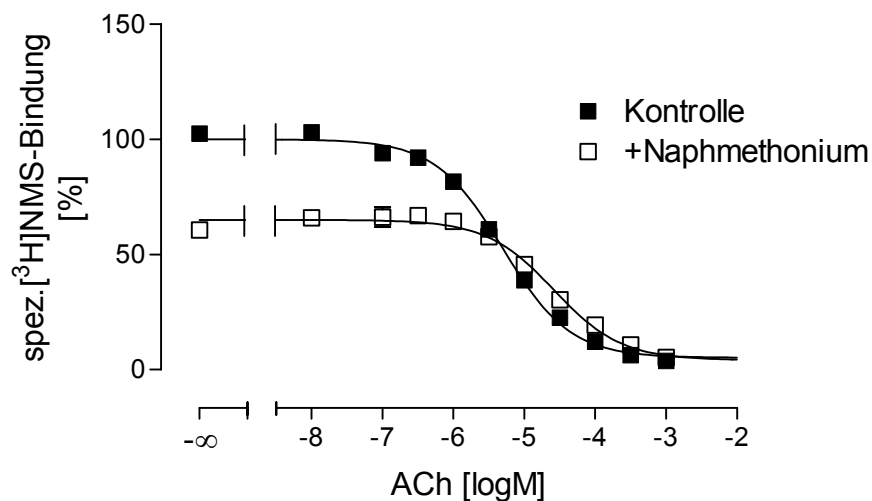
**Abb. 46** Inhibition der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]NMS (0,4 nM) durch Acetylcholin (ACh) in An- und Abwesenheit (Kontrolle) von Naphmethonium ( $1 \times 10^{-5}$  M) am muskarinischen  $\text{M}_3$ -Rezeptor (Homogenat vom 11.05.04). Ordinate: spezifische [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit von Acetylcholin und Naphmethonium. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von Acetylcholin. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4. Die Inkubationszeit betrug 4,5 Stunden.

In Gegenwart von  $1 \times 10^{-5}$  M Naphmethonium kommt es am  $\text{M}_3$ -Rezeptor zu einer signifikanten Senkung der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung unter Kontrollbedingungen. Das obere Plateau der Naphmethonium-Kurve liegt bei  $82 \pm 1$  %. Beide Kurven haben eine Steigung, die nicht signifikant verschieden von -1 ist ( $n(\text{Kontrolle}) = -0,88 \pm 0,09$ ;  $n(\text{Naphmethonium}) = -1,06 \pm 0,15$ ).



**Abb. 47** Inhibition der Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  ( $0,4 \text{ nM}$ ) durch Acetylcholin (ACh) in An- und Abwesenheit (Kontrolle) von Naphmethonium ( $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) am muskarinischen  $\text{M}_4$ -Rezeptor (17.05.04). Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit von Acetylcholin und Naphmethonium. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von Acetylcholin. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit triplizierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4. Die Inkubationszeit betrug 4,5 Stunden.

Das obere Plateau der Naphmethonium-Kurve ( $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) am  $\text{M}_4$ -Rezeptor unterscheidet sich mit  $107 \pm 1 \%$  nicht signifikant von dem der Kontrollkurve. In einem von drei Experimenten weicht sowohl das Steigungsmaß  $n$  der Kontrollkurve ( $n = -0,76 \pm 0,07$ ) als auch der der Alloster-Kurve ( $n = -0,81 \pm 0,07$ ) signifikant von  $-1$  ab (gemeinsame Steigung von Kontroll- und Alloster-Kurve in diesem Experiment gemäß Auswertung mittels des Computerprogramms Graphpad PRISM<sup>®</sup>  $n = -0,79$ ). Die gemittelten Steigungen aus drei Experimenten betragen für die Kontrollkurve  $n = -0,84 \pm 0,04$  und für die Allosterkurve  $n = -0,91 \pm 0,05$ . Weder die gemittelten Steilheitswerte von Kontroll- und Allosterkurve noch die Werte der Einzelexperimenten unterschieden sich signifikant von einander.



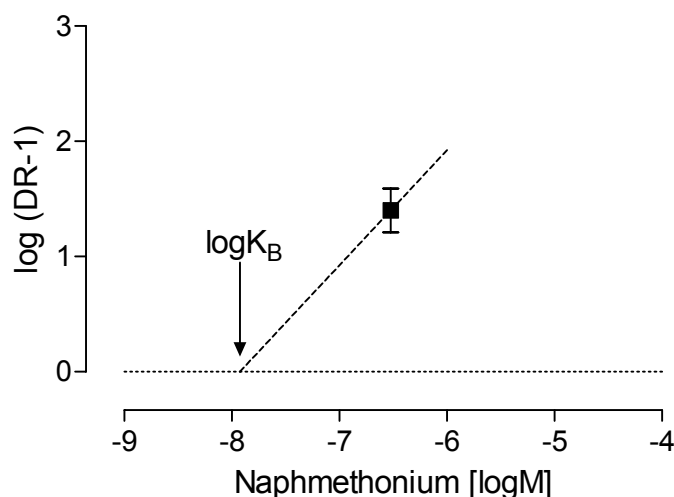
**Abb. 48** Inhibition der Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  ( $0,4 \text{ nM}$ ) durch Acetylcholin (ACh) in An- und Abwesenheit (Kontrolle) von Naphmethonium ( $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) am muskarinischen  $\text{M}_5$ -Rezeptor (Homogenat vom 22.04.04). Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit von Acetylcholin und Naphmethonium. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von Acetylcholin. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen, wobei für die einzelnen Konzentrationen 1-3 Messwerte erhoben wurden. Kurvenanpassung: Gleichung 4. Die Inkubationszeit betrug 4,5 Stunden.

Aufgrund der negativen Kooperativität von Naphmethonium gegenüber  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  am  $\text{M}_5$ -Subtyp startet die Alloster-Kurve hier auf einem signifikant niedrigeren Niveau (oberes Plateau bei  $65 \pm 1 \%$ ) im Vergleich zur Kontrollkurve. In einem von 3 Experimenten weicht das Steigungsmass  $n$  der Kontrollkurve mit  $n = -0,67 \pm 0,07$  signifikant von  $-1$  ab. Eine signifikante Unterschied zur Steigung der Allosterkurve ( $n = -0,93 \pm 0,12$ ) lag nicht vor (gemeinsame Steigung von Kontroll- und Allosterkurve zur Auswertung nach Arunlakshana und Schild in diesem Experiment nach PRISM<sup>®</sup>-Auswertungsprogramm  $n = -0,75$ ). Die gemittelten Steigungen aus drei Experimenten betragen am  $\text{M}_5$ -Rezeptor für die Kontrollkurve  $n = -0,73 \pm 0,03$  und für die Allosterkurve  $n = -0,93 \pm 0,00$ .

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass W84-Derivate mit Agonisten oft stark negativ kooperativ interagieren [68]. C. Schmalenbach zeigte [50], dass der allosterische Modulator Naphmethonium mit Acetylcholin am  $\text{M}_2$ -Rezeptor ebenfalls stark negative Kooperativität zeigt, somit also eine pseudokompetitive Interaktion

eingeht. Unter der Annahme dieser pseudokompetitiven Interaktion würde man für eine Auswertung nach Arunlakshana und Schild [60] eine Gerade mit der Steigung 1 erwarten. Der Schnittpunkt einer solchen Geraden mit der x-Achse liefert den Parameter  $pK_B$ , der eine Abschätzung für die Affinität des Modulators zum freien Rezeptor darstellt. Stimmt dieser Parameter mit den in heterologen Interaktionsexperimenten ermittelten  $pK_A$ -Werten überein, stützt dies die These, dass die allosterischen Modulatoren mit Acetylcholin eine pseudokompetitive Interaktion eingehen.

Abb. 49 zeigt exemplarisch am Beispiel des Subtyps  $M_2$  die Abschätzung der Kenngröße  $pK_B$  als Maß der Affinität zum freien Rezeptor mittels Schild-Auftragung.



**Abb. 49** Schild-Auftragung der Rechtsverschiebung der Kurven aus Abb. 45 durch Naphmethonium am  $M_2$ -Rezeptor. Ordinate: dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktors DR und 1. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von Naphmethonium. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung. Unter der Annahme einer starken negativen Kooperativität zwischen Naphmethonium und Acetylcholin (pseudokompetitive Interaktion) wurde durch den Punkt eine Gerade mit der Steigung 1 gelegt (Näheres siehe Text).

Wie bereits im Abschnitt 2.3.4.1 beschrieben, wurde anhand von Gleichung 13 der Verschiebungsfaktor DR (dose ratio) ermittelt und zur graphischen Auftragung nach Arunlakshana und Schild [60] zu  $\log(DR-1)$  umgeformt. Durch den so ermittelten Punkt im Koordinatensystem wurde eine Gerade mit der Steigung 1 gelegt und ein fiktiver Wert  $\log K_B$  als Schnittpunkt mit der Abszisse ermittelt. Im Fall des Subtyps  $M_2$

wäre bei einer pseudokompetitiven Interaktion ein  $pK_B$ -Wert von  $7,92 \pm 0,19$  ableitbar.

An den restlichen Subtypen wurde analog Abb. 49 verfahren und die Parameter DR-1 und  $pK_B$  bestimmt. Tab. 41 fasst die Ergebnisse an allen Subtypen zusammen.

	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
$pK_A$	$6,59 \pm 0,02$ $n = 4$	$7,76 \pm 0,01$ $n = 4$	$5,68 \pm 0,02^*$ $n = 3$	$6,86 \pm 0,01$ $n = 5$	$5,06 \pm 0,03$ $n = 4$
Naphmethonium [logM]	-6,00	-6,52	-5,00	-6,52	-4,52
$pIC_{50}$ Kontrolle	$4,69 \pm 0,09$ $n = 3$	$6,48 \pm 0,21$ $n = 3$	$4,92 \pm 0,10$ $n = 3$	$5,24 \pm 0,06$ $n = 3$	$5,30 \pm 0,02$ $n = 3$
$pIC_{50}$ Naphmeth.	$4,13 \pm 0,09$ $n = 3$	$5,06 \pm 0,17$ $n = 3$	$4,30 \pm 0,15$ $n = 3$	$4,77 \pm 0,12$ $n = 3$	$4,58 \pm 0,10$ $n = 3$
DR-1	$2,68 \pm 0,60$ $n = 3$	$29,49 \pm 9,51$ $n = 3$	$3,19 \pm 0,47$ $n = 3$	$2,03 \pm 0,42$ $n = 3$	$4,56 \pm 1,35$ $n = 3$
$pK_B$	$6,41 \pm 0,09$ $n = 3$	$7,92 \pm 0,19$ $n = 3$	$5,49 \pm 0,06^*$ $n = 3$	$6,81 \pm 0,08$ $n = 3$	$5,14 \pm 0,13$ $n = 3$

**Tab. 41** Vergleich der  $pK_A$ -Werte von Naphmethonium aus heterologen Interaktionsversuchen (3.4.4) mit den extrapolierten  $pK_B$ -Werten aus der Schild-Auftragung an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Angegeben ist jeweils die eingesetzte Konzentration Naphmethonium, die Wendepunkte ( $pIC_{50}$ ) der Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie in Gegenwart der angegebenen Konzentration Naphmethonium und der errechnete Wert DR-1. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, sowie Anzahl der Experimente.

\*:  $pK_A$ - und  $pK_B$ -Wert unterscheiden sich statistisch signifikant von einander.

Die ermittelten  $pK_B$ -Werte sind Schätzwerte für die Affinität des Allostere zum unbesetzten Rezeptor unter der Annahme einer pseudokompetitiven Interaktion. Bereits in heterologen Interaktionsexperimenten mit [ $^3H$ ]NMS wurde die Größe  $pK_A$  bestimmt, welche ein Maß für die Affinität des Allostere, in diesem Fall Naphmethonium, zum freien Rezeptor darstellt (siehe 3.4.4). Ein statistischer Vergleich der beiden Parameter ergibt, dass sich die betrachteten Größen nur am Rezeptorsubtyp M<sub>3</sub> signifikant unterscheiden. Der Unterschied beträgt hier allerdings auch nur 0,19 log Einheiten. An den anderen Subtypen stimmen die Werte teilweise sehr genau überein. Durch die Übereinstimmung wird die Vermutung gestützt, dass Naphmethonium mit Acetylcholin an jedem Rezeptorsubtyp stark negativ kooperativ bzw. pseudokompetitiv interagiert.



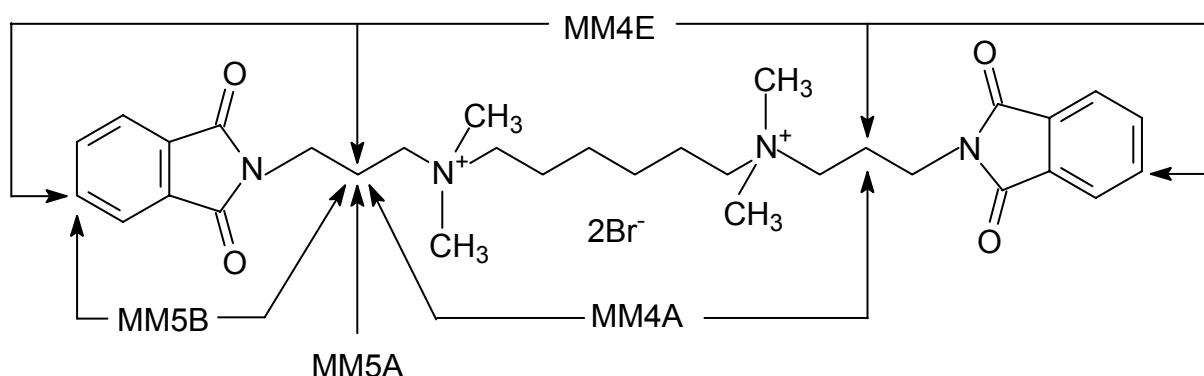
## 4 Diskussion

### **4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten allosterischen Alkan-Bisammonium-Verbindungen an $M_2$ -Rezeptoren**

Bei den Alkan-Bisammonium-Verbindungen handelt es sich um eine Gruppe potenter allosterischer Modulatoren an muskarinischen Rezeptoren. Die Ausgangsverbindung dieser Substanzreihe W84 zeigt in Mg, Tris, Cl,  $P_i$ -Puffer am  $M_2$ -Rezeptor eine Affinität im mikromolaren Bereich. Diese Affinität kann durch strukturelle Veränderungen am molekularen Grundgerüst deutlich gesteigert werden. Raasch et al. (2002) [48] zeigten, dass durch Methylierung eines bzw. beider lateralen Phthalimid-Ringe die Affinität zum  $M_2$ -Rezeptor angehoben werden kann. Die Autoren zeigten weiter, dass durch Dimethylierung der Propylseitenkette die negative Kooperativität der Substanzen mit N-Methylscopolamin (NMS) aufgehoben werden konnte bzw. sogar positive Kooperativität hervorgerufen werden konnte. Diese Befunde wurden von Muth et al. [47] bestätigt. Hier konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich bezüglich der Affinitäten kein signifikanter Unterschied zwischen symmetrischen und unsymmetrischen Substanzen ergibt. Des weiteren wurden in jener Arbeit hochpotente Substanzen vorgestellt, welche durch eine weitere Modifizierung des lateralen Ringsystems eine Affinität im nanomolaren Bereich aufweisen. Aufbauend auf diesen Befunden wurden die in dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen untersucht, um zu ermitteln, inwiefern weitere Strukturveränderungen zu einer zusätzlichen Erhöhung der Affinität bzw. zu einer Beeinflussung der Kooperativität führen.

### 4.1.1 Methylierungsgrad

In der vorliegenden Arbeit sind im Abschnitt 3.3.1 Substanzen aufgeführt, welche sich in ihrem Methylierungsgrad unterscheiden. Abb. 50 gibt einen schematischen Überblick über die strukturellen Modifikationen der untersuchten Verbindungen.



**Abb. 50** Untersuchte W84-Derivate mit Methylierungen an unterschiedlichen Stellen des Moleküls.  
 —→ : Monomethylierung.

Wie bereits oben erwähnt, ist bekannt, dass an der Seitenkette dimethylierte W84-Derivate eine gesteigerte Affinität und Kooperativität mit NMS ausweisen [48]. Mit den hier untersuchten Substanzen sollte geklärt werden, ob hierfür eine Dimethylierung zwingend notwendig ist oder ob eine Monomethylierung für diese Wirksamkeitsänderungen bereits ausreichend ist.

Es zeigte sich, dass weder die Affinitäten noch die Kooperativität der an den Seitenketten monomethylierten Substanzen MM5A und MM4A signifikant verschieden von den Werten der Ausgangsverbindung W84 sind. Raasch et al. [48] fanden, dass die zu MM5A korrespondierende, dimethylierte Verbindung (OS30) zu einem deutlichen Affinitätsanstieg von bis zu einer Dekade im Vergleich zu W84 führt. Ein quartärer Kohlenstoff in der Propylseitenkette ist somit essentiell für eine Affinitätssteigerung. Eine Monomethylierung ist hierfür nicht ausreichend.

Neben den Phthalimid-Derivaten wurden auch Methylphthalimid-Derivate von W84 mit monomethylierten Seitenketten (MM5B und MM4E) verglichen. Referenzsubstanz ist hierbei das von Raasch et al. [48] untersuchte, am Phthalimid methylierte W84-Derivat WB41, das im Vergleich zu W84 bereits eine gehobene Affinität zeigt. Eine zusätzliche Monomethylierung der Seitenkette (MM5B) führt zu kleinen, allerdings



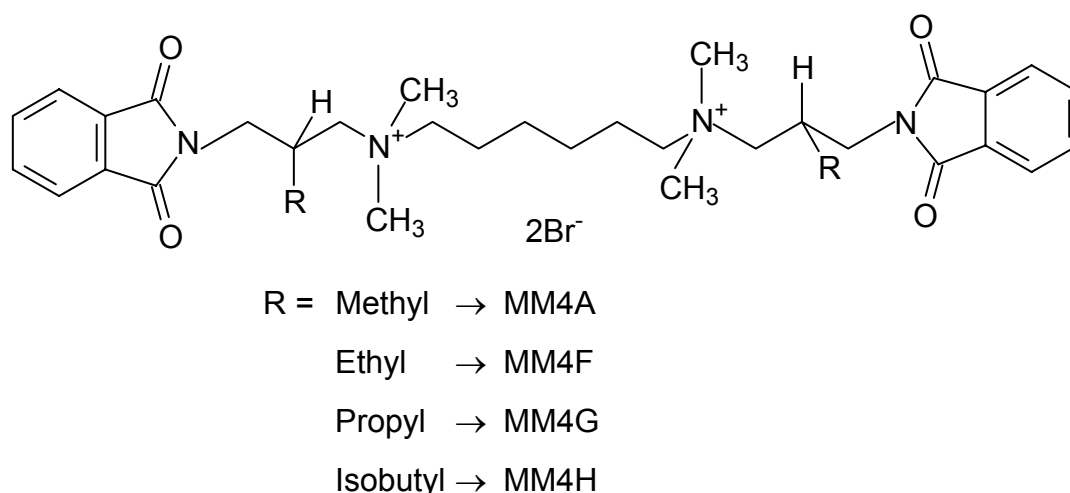
nicht signifikanten Veränderungen der Affinitäten zum freien und NMS-besetzten Rezeptor im Vergleich zu WB41, was mit einer Anhebung der Kooperativität mit NMS auf ein neutrales Niveau einhergeht. Die einzige monomethylierte Substanz, die untersucht wurde und die positive Kooperativität mit NMS zeigte, war MM4E. Das Affinitätsniveau am NMS-besetzten Rezeptor wurde im Vergleich zu WB41 signifikant angehoben. Da die entsprechende Phthalimid-Verbindung MM4A negativ kooperativ mit NMS interagierte, ist die positive Kooperativität von MM4E auf die beiden lateralen Methylphthalimide zurückzuführen. Leider stand keine entsprechende Verbindung mit einseitigem Methylphthalimid zur Verfügung, um zu testen, ob dies bereits für eine positive Kooperativität ausreichend wäre.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei den höher affinen Methylphthalimid-Derivaten (MM4E, MM5B) im Gegensatz zu den Phthalimid-Derivaten (MM4A, MM5A) eine Monomethylierung der Seitenketten größere Auswirkungen hat. Die Affinitäten werden zwar meist nur geringfügig verändert, dies hat jedoch eine Anhebung der Kooperativität mit NMS bis in den positiven Bereich zur Folge. Bei den Phthalimid-Derivaten hat eine Monomethylierung der Seitenketten weder Einfluss auf die Affinität, noch auf die Kooperativität mit NMS.

Die hier besprochenen Substanzen besitzen durch die Monomethylierung der Seitenketten ein bzw. zwei Stereozentren und wurden in der vorliegenden Arbeit als Racemate eingesetzt. Eine Enantiomerentrennung zur Untersuchung der Stereoselektivität ist für diese Substanzen noch nicht durchgeführt worden, ist jedoch für Substanzen im höher affinen Bereich angedacht und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

#### **4.1.2 Größe der Substituenten der Seitenkette**

Die Verbindungen, deren Bindungsparameter in Abschnitt 3.3.2 vorgestellt wurden, unterscheiden sich in der Größe des Substituenten in der Propylseitenkette der Alkan-Bisammonium-Struktur. Das laterale Ringsystem ist im Vergleich zu W84 hierbei nicht verändert. Es wurde jeweils eine Monoalkylierung an beiden Seitenketten des Grundgerüsts vorgenommen. Eine Übersicht über die Strukturformeln wird in Abb. 51 gegeben.



**Abb. 51** Strukturformeln von W84-Derivaten mit unterschiedlich großen Seitenkettensubstituenten

Leider war es aus synthesesetechnischer Sicht bislang nicht möglich, an der Seitenkette disubstituierte Verbindungen mit größeren Alkylresten zu erzeugen [49], von welchen eine größere Beeinflussung der Affinität und besonders auch der Kooperativität hätte erwartet werden können [48]. Jedoch zeigen auch die beidseitig monoalkylierten Substanzen ein verändertes Affinitäts- und Kooperativitätsprofil.

Gemäß den vorliegenden Daten macht es keinen Unterschied, ob die Seitenkette mit einem Methyl- oder Ethyl-Rest substituiert wird. Die entsprechenden Verbindungen MM4A und MM4F unterscheiden sich weder bezüglich der Affinitäten noch bezüglich der Kooperativität signifikant voneinander. Einen merklichen Anstieg der Affinitäten verursacht erst eine Seitenkettensubstitution mit einem Propyl-Rest (MM4G), wobei die Affinität zum [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor signifikant verschieden von den Affinitäten der kürzer substituierten Verbindungen ist. Am unbesetzten Rezeptor ist kein signifikanter Unterschied feststellbar (ungepaarter t-Test,  $p > 0,05$ ). Durch den Propyl-Substituenten (MM4G) wird die negative Kooperativität der Ausgangsverbindungen auf ein nahezu neutrales Niveau gehoben. Durch eine weitere Vergrößerung des Substituenten auf einen Isobutyl-Rest (MM4H) kommt es zu keiner weiteren Steigerung der Affinität zum [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor. Die Affinität zum freien Rezeptor wird weiter erhöht. Sie ist signifikant verschieden von den Affinitäten der Substanzen MM4A und MM4F, jedoch nicht signifikant verschieden von der Affinität von MM4G. Durch diese Steigerung der Affinität zum freien Rezeptor zeigt MM4H negative Kooperativität mit [ $^3\text{H}$ ]NMS. In

Dissoziationsversuchen mit den Verbindungen mit den beiden größten Substituenten (MM4G und MM4H) wurden Kurven erhalten, deren Steigung signifikant verschieden von -1 ist. In dieser Hinsicht gleicht die Wirkung formal derjenigen von atypischen allosterischen Modulatoren [27, 69].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass jeweils nur die Substanzen mit Propyl- bzw. Isobutyl-Substituenten gesteigerte Affinitäten zum M<sub>2</sub>-Rezeptor zeigten, wobei nur die Substanz mit Propyl-Substituenten (MM4G) in der Lage war, die negative Kooperativität mit NMS abzuschwächen. Da einseitig dimethylierte Substanzen bereits zu einer größeren Steigerung der Affinität im Vergleich zu beidseitig monomethylierten Verbindungen führen, kann vermuten werden, dass eine einseitige Dialkylierung mit größeren Substituenten die Affinität zusätzlich steigern würde.

#### 4.1.3 Aminierung und Nitrierung

Mit der Substanz MM3J wurde erstmals eine Verbindung synthetisiert, die dank einer Aminogruppe am lateralen Naphthalimidringsystem eine zusätzlich verstärkte Fluoreszenz aufweist [49]. Da sich Naphthalimid-Derivate generell durch eine hohe allosterische Potenz auszeichnen, bietet sich der Einsatz fluoreszierender W84-Derivate zur Charakterisierung allosterischer Interaktionen in Bindungsstudien oder zur Verfolgung des „Rezeptortraffickings“ von Muskarinrezeptoren an [49]. In der vorliegenden Arbeit ging es darum, Affinität und Kooperativität nach den herkömmlichen, unter 2 beschriebenen Methoden zu untersuchen und einen Vergleich zu nicht-aminieren Verbindungen aufzustellen. Neben der eigentlichen fluoreszierenden Verbindung MM3J wurden auch deren Synthesestufen MM3L und MM3M untersucht, welche anstelle des Amino-Substituenten eine Nitrogruppe in Position 3 bzw. 4 tragen. Diese Substanzen zeigen allerdings im Vergleich zu Naphmethonium keine verstärkte Fluoreszenz [49].

Durch die Aminierung des lateralen Naphthalimidringsystems verändern sich die Affinitäten der Verbindung im Vergleich zu Naphmethonium nicht signifikant. Jedoch sinkt die Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor geringfügig, während gleichzeitig die Affinität zum freien Rezeptor leicht ansteigt. Dies hat zur Folge, dass die Verbindung MM3J im Vergleich zu Naphmethonium nur noch eine verminderte

positive Kooperativität aufweist. Die Substanzen MM3L und MM3M, welche Nitrogruppen als Substituenten am lateralen Ringsystem tragen, zeigen eine signifikant geringere Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor als Naphmethonium. Die Affinität zum freien Rezeptor liegt bei beiden Substanzen leicht höher als bei der Ausgangsverbindung. Der Unterschied ist auf Grund des relativ großen Standardfehlers von Naphmethonium allerdings nicht signifikant. Als Konsequenz der leicht verschobenen Affinitäten liegen auch hier die Kooperativitätsfaktoren lediglich im neutralen bzw. schwach positiven Bereich.

Durch eine Aminierung des Naphthalimids werden die Affinitäten der Substanz also nur marginal verändert. Die positive Kooperativität der Ausgangssubstanz mit [ $^3\text{H}$ ]NMS wird hingegen abgeschwächt. Der Nitro-Substituent der Substanzen MM3L und MM3M nimmt ebenfalls nur geringen Einfluss auf die Affinitäten. Aufgrund der Größe des Substituenten wären auch stärkere sterische Beeinflussungen denkbar gewesen.

#### 4.1.4 Silizium-haltige und tertiäre Verbindungen

Die Substanz TDF wurde im Hinblick auf einen Einsatz zur Positronen-Emissions-Tomographie (PET) entwickelt. TDF trägt im Vergleich zur Grundstruktur der Alkan-Bisammonium-Verbindungen an beiden Enden des Moleküls ein Naphthalimid-Ringsystem. Ein quartärer Stickstoff wurde durch ein dimethyliertes Silizium-Atom ausgetauscht, wodurch eine permanente positive Ladung des Moleküls entfernt wurde. Der zweite Stickstoff liegt tertiär, mit einem Fluorethylsubstituenten vor. Das Fluor könnte zum Einsatz in der PET durch ein radioaktives  $^{18}\text{F}$  ersetzt werden. Da der zweite Stickstoff ebenfalls nicht quartär vorliegt und das Molekül somit erst abhängig vom umgebenden pH-Milieu protoniert und geladen vorliegt, wurde die Lipophilie der Substanz weiter erhöht. Dies steigert die Wahrscheinlichkeit, dass die Verbindung die Blut-Hirn-Schranke überwindet, was eine wichtige Voraussetzung für eine klinische Anwendung darstellt. Als Referenz wurde die Verbindung TDH<sub>2</sub> untersucht, die ebenfalls ein Silizium statt eines Stickstoffs enthält und am zweiten Stickstoff unsubstituiert ist, sowie das bistertiäre W84-Derivat MM8A, das ebenfalls an beiden Enden des Moleküls ein Naphthalimid-Ringsystem trägt.

Die bistertiäre Verbindung MM8A zeigt im Vergleich zum bisquartären Alkan-Bisammonium-Analogon WB64 in etwa gleiche Affinitäts- und Kooperativitätswerte. Tendenziell liegen die Affinitäten der tertiären Verbindung leicht unter denen der quartären Verbindung, was sich aber nur am [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor in einem signifikanten Unterschied widerspiegelt. Die Silizium-haltigen Substanzen TDH<sub>2</sub> und TDF liegen mit ihren Affinitätswerten am [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor deutlich unterhalb der Alkan-Bisammonium-Verbindungen. Der Unterschied beträgt bei der Substanz TDH<sub>2</sub> ca. 1,4 Dekaden, bei der Substanz TDF sogar ca. 2 Dekaden. Die Werte der Verbindung TDF liegen damit leicht unterhalb der Affinitäten des Prototyp-Modulators W84. Da sich die Affinitäten für den [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor und den freien Rezeptor in etwa jeweils gleich verschieben, bleibt die negative Kooperativität der Substanzen unbeeinflusst. Ein Phänomen, dass bei Silizium-haltigen Substanzen oftmals beobachtet werden kann, ist eine relativ steile Konzentrations-Effekt-Kurve bei Dissoziationsexperimenten [42, 62]. Dies lässt sich auch im Fall der beiden hier untersuchten Silizium-haltigen Verbindungen feststellen, was wiederum auf ein atypisches Bindungsverhalten der Substanzen hindeutet. Ob die Affinität der Substanz TDF zum muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptor zum Einsatz als PET-Ligand ausreichend ist bzw. ob die Substanz eine hinreichende ZNS-Gängigkeit aufweist, müsste in *in-vivo*-Testungen belegt werden.

#### 4.1.5 Weitere Strukturveränderungen

Neben den bisher besprochenen Substanzen, die sich durch Atomaustausch oder Variation der Substituenten am Grundgerüst der Alkan-Bisammonium-Verbindungen unterscheiden, wurde auch eine verkürzte Verbindung dieser Substanzreihe untersucht. Die Verbindung MM7A enthält dabei analog dem Naphmethonium einen affinitätssteigernden Naphthalimidring sowie eine Dimethylierung der Seitenkette. Die andere Molekülhälfte mit dem zweiten quartären Stickstoff und dem lateralen Phthalimid wurde entfernt. Im Vergleich zum kompletten Naphmethonium verliert die Substanz am Orthoster-besetzten Rezeptor durch die Halbierung 2,6 Dekaden an Affinität, am freien Rezeptor ca. 2 Dekaden. Dieser Affinitätsverlust entspricht in etwa den Werten, die für verkürzte Derivate des W84 gefunden wurden [37]. Dadurch,

dass die affinitäts- und kooperativitätsbestimmenden Strukturmerkmale des Naphmethonium (Naphthalimid und Seitenkettenemthylierung) im verkürzten Derivat enthalten sind, liegt die Affinität der Verbindung MM7A im Vergleich mit verkürzten W84-Derivaten noch relativ hoch. Durch den vergleichsweise größeren Verlust an Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor ist die halbierte Substanz nicht mehr positiv kooperativ mit NMS, sondern zeigt neutrale Kooperativität. Ein Absinken der Kooperativität in den stärker negativen Bereich konnte auch für verkürzte Derivate des W84 gezeigt werden [37].

Bei einer weiteren Verbindung (RP25) wurden die Seitenketten des Grundgerüsts beidseitig um ein C-Atom verlängert und in der Mitte jeweils mit einer Dreifachbindung versehen. Diese Butinyl-Seitenketten weisen gegenüber den Propyl-Seitenketten eine relativ große Starrheit auf. Die verlängerten Seitenketten sowie die Dreifachbindung der Substanz RP25 nehmen nur geringen Einfluss auf die Affinität. Die Verbindung RP25 zeigt nicht signifikant unterschiedliche Affinitätswerte im Vergleich zu W84. Eine große Flexibilität der Seitenketten scheint zur Aufrechterhaltung der Affinität nicht unbedingt von Nöten zu sein. Die nicht signifikanten Veränderungen der Affinitäten führen jedoch dazu, dass RP25 neutral kooperativ mit NMS interagiert. Wie schon bei den unter 4.1.1 besprochenen Substanzen zeigt sich auch hier wieder, dass vor allem die Beschaffenheit der Seitenkette entscheidend für eine Anhebung der Kooperativität ist.

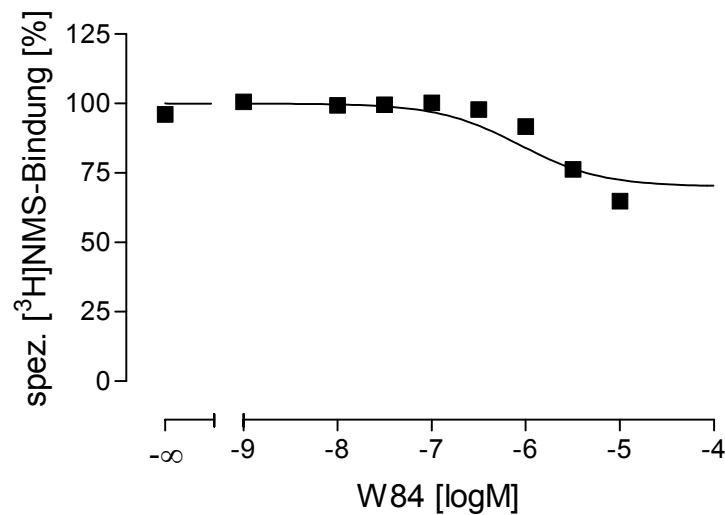
#### ***4.2 Auswertung der Gleichgewichtsbindungsexperimente unter Berücksichtigung der dissoziationsverzögernden Wirkung der Allosterie***

Dem Kooperativitätsmodell zufolge sollte das Produkt aus dem Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Allosterbindung  $K_A$  identisch sein mit der halbmaximal NMS-dissoziationsverzögernden Konzentration des Allostere  $EC_{0,5diss}$ . In einigen Fällen bestanden Unterschiede, dies war besonders auffällig in der Versuchsserie mit W84 an humanen  $M_2$ -Rezeptoren in Membranen aus CHO-Zellen (S. 86). Hinzu kam, dass der aus den Gleichgewichtsbindungs-

experimenten ermittelte Wert für  $pK_A$  kleiner war, als aufgrund von Voruntersuchungen für die Wirkung von W84 an  $M_2$ -Rezeptoren zu erwarten war [47,48]. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Auswertung der Gleichgewichtsbindungsexperimente auf der Basis der Ehlert-Gleichung die gleichzeitige Abschätzung von zwei Parameterwerten beinhaltet, nämlich den Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_A$ .  $\alpha$  lässt sich um so besser bestimmen, je geringer die Auslenkung der [ $^3H$ ]NMS-Bindung ausfällt. Dementsprechend ist die Abschätzung des Parameterwertes für  $\alpha$  schlecht möglich, wenn die [ $^3H$ ]NMS-Bindung durch das Alloster in hohen Konzentrationen vollständig verhindert wird, also auf das Niveau der unspezifischen Bindung abfällt („pseudokompetitive“ Wirkung des Allosters). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Alloster-Bindung  $K_A$  lässt sich hingegen um so besser bestimmen, je stärker die [ $^3H$ ]NMS-Kurve einer pseudokompetitiven Interaktion entspricht. Im Falle von W84 zeigte sich eine unvollständige Hemmung der [ $^3H$ ]NMS-Bindung, wobei im Hinblick auf die Auswertung erschwerend hinzukommt, dass das untere Kurvenplateau durch die Datenpunkte nicht sicher beschrieben wird, da der Einsatz höherer W84-Konzentrationen wegen der dann notwendigen Verlängerung der Inkubationszeit angesichts der spontanen Zerfallsneigung von W84 nicht sinnvoll erschien.

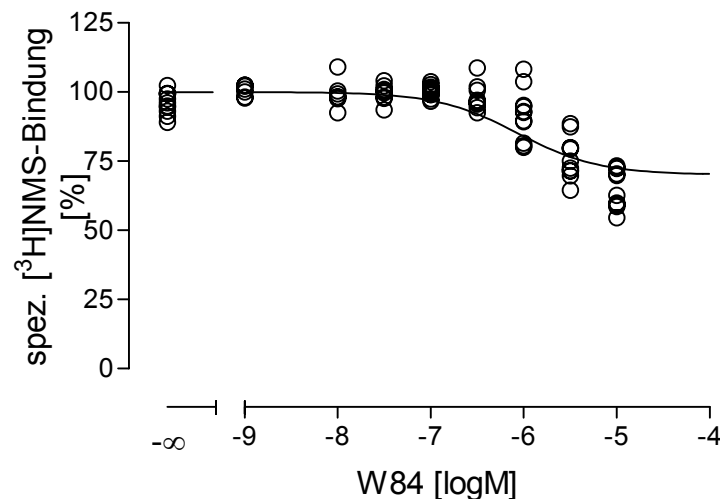
Das Kooperativitätsmodell berücksichtigt den ternären Komplex aus Alloster, Radioorthoster und Rezeptor. Die Affinität des Allosters zum Radioorthoster-besetzten Rezeptor wird in den [ $^3H$ ]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Experimenten in Form des  $pEC_{0,5diss}$ -Werts bestimmt. Dieses Kenntnis kann in die Auswertung der Gleichgewichtsbindungsexperimente eingebracht werden, in dem die eine der beiden Variablen,  $\alpha$  oder  $K_A$ , unter Nutzung der Beziehung  $\alpha \times K_A = EC_{0,5diss}$  ersetzt wird. So kann in die Ehlert-Gleichung anstelle von  $\alpha$  stattdessen  $\frac{EC_{0,5diss}}{K_A}$  eingesetzt werden.

Der aus einer solchen Kurvenanpassung resultierende Wert für  $K_A$ , hier bezeichnet als  $K_A(\text{indirekt})$ , ergab eine Affinität von W84 zum  $M_2$ -Rezeptor, die im Lichte der Ergebnisse anderer Untersuchungen plausibel erschien. In der Kurvenanpassung (Abb. 52) wurden die Mittelwerte von der Kurve zwar nicht so gut getroffen, wie in der Anpassung mit 2 Variablen (Abb. 28, S. 87), werden jedoch die in den zugrundeliegenden 11 Einzelexperimenten erhaltenen Datenpunkte aufgetragen, so wird deutlich, dass die Kurve jedes der Datenkollektive trifft (Abb. 53).



**Abb. 52** Einfluss von W84 auf die Bindung von [<sup>3</sup>H]NMS (0,4 nM) am M<sub>2</sub>-Rezeptor in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Kurvenanpassung mittels der modifizierten Ehlert-Gleichung unter Verwendung von EC<sub>0,5diss</sub>, indem der Parameter  $\alpha$  durch EC<sub>0,5diss</sub>/K<sub>A</sub> ersetzt wurde (Reduktion der Variablen von zwei auf eine). Ordinate: spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von W84. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 11 unabhängigen Experimenten mit triplicierten Ansätzen. Die Inkubationszeit betrug 6 Stunden.





**Abb. 53** Einfluss von W84 auf die Bindung von [<sup>3</sup>H]NMS (0,4 nM) am M<sub>2</sub>-Rezeptor in Mg, Tris, Cl, P<sub>i</sub>-Puffer, pH 7,3 bei 37°C. Kurvenanpassung mittels der modifizierten Ehlert-Gleichung unter Verwendung von EC<sub>0,5diss</sub>, indem der Parameter  $\alpha$  durch EC<sub>0,5diss</sub>/K<sub>A</sub> ersetzt wurde (Reduktion der Variablen von zwei auf eine). Ordinate: spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration von W84. Dargestellt sind die Werte aus 11 unabhängigen Experimente, jeweils Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. Die Inkubationszeit betrug 6 Stunden.

Somit scheint die EC<sub>0,5diss</sub>-basierte Bestimmung der Alloster-Bindungskonstanten K<sub>A</sub> ein zulässiges, geeignetes und angebrachtes Verfahren zu sein, um die Affinität von Allosteren zu freien Muskarinrezeptoren zu ermitteln.

Der Kooperativitätsfaktor  $p\alpha$  wurde dann rechnerisch aus der Differenz von  $pEC_{0,5diss}$  und  $pK_A$  bestimmt, weshalb hier kein Standardfehler angegeben werden konnte. Die rechnerische Auswertung der Gleichgewichtsbindungskurven erfolgte anhand der vereinigten Datensätze aller durchgeführten Experimente an einem Subtyp. Da, wie oben beschrieben, die unter Verwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung unter Verwendungen von EC<sub>0,5diss</sub> erhaltenen K<sub>A</sub>-Werte plausibel erscheinen, werden in den folgenden Abschnitten diese Parameterwerte zur Diskussion herangezogen.

### **4.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Hinblick auf die Subtypselektivität**

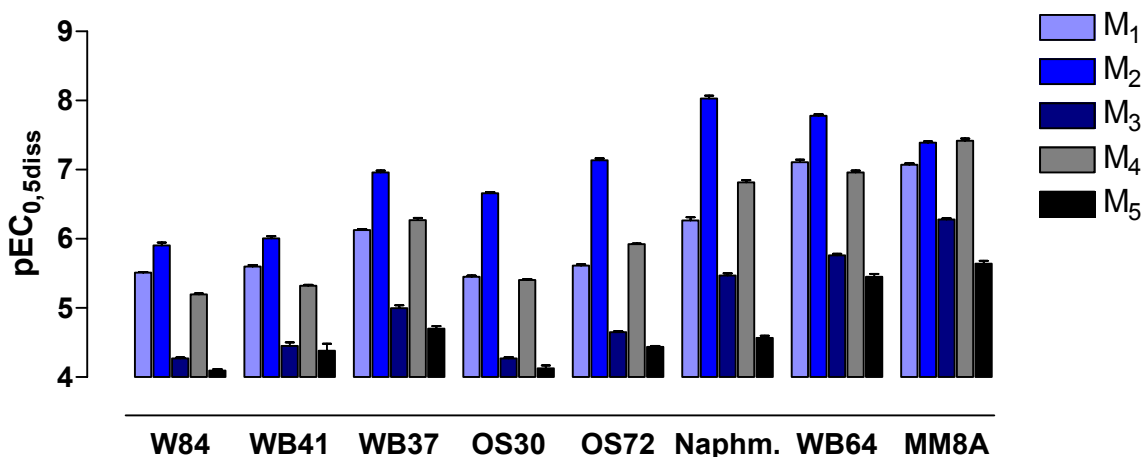
Die Betrachtung der Subtypselektivität einer Substanz, die als potentieller neuer Arzneistoff eingesetzt werden soll, ist essentiell. Für die muskarinischen Rezeptoren hat es sich bis jetzt allerdings als schwierig herausgestellt, einen subtypselektiven orthosterischen Liganden zu entwickeln, da die orthosterische Bindungsstelle innerhalb der fünf muskarinischen Subtypen weitgehend konserviert ist.

Einer der ersten muskarinischen Liganden mit ausgeprägter Subtypselektivität ist AF-DX 384, das auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Für AF-DX 384 wird diskutiert, dass es zumindest einen Teil seiner Subtypselektivität durch Bindung an die, innerhalb der Subtypen, weniger stark konservierte allosterische Bindungsstelle gewinnt [65]. Im IUPHAR Receptor Compendium [70] ist für die Affinität von AF-DX 384 zum Rezeptorsubtyp  $M_2$  ein Bereich von  $pK_i = 8,2-9,0$  angegeben. Die Affinität zum Subtyp  $M_5$  ist mit  $pK_i = 6,3$  beschrieben, was eine Spanne der Subtypselektivität von ca. 2-2,5 Dekaden ergibt. Die Autoren Dörje et al. (1991) [64] fanden eine Spanne zwischen  $M_2$  und  $M_5$  für AF-DX 384 von ca. 2 Dekaden, was mit den in dieser Arbeit erhobenen Werten gut übereinstimmt. Bei beiden Quellen ist der Unterschied zwischen den Affinitäten zu  $M_2$  und dem darauf folgenden Subtyp ( $M_4$ ) relativ gering. Das IUPHAR Receptor Compendium gibt die gleichen Werte für die Affinitäten zu  $M_2$  und  $M_4$  an und auch in der Arbeit von Dörje et al. sowie in der vorliegenden Arbeit liegen zwischen den Affinitäten zu  $M_2$  und  $M_4$  lediglich 0,2 log Einheiten. Spezielle Dimethinden-Analoga zeigen hier offenbar ein besseres Rezeptoraffinitätsprofil, wie Böhme et al. (2002) [71] zeigten. Die Spanne der Subtypselektivität zwischen  $M_2$  und  $M_5$  des Diisoproyl-Analogons zu Dimethinden wird hier zwar auch mit nur knapp 2 Dekaden angegeben, jedoch liegt die Affinität zu  $M_2$  gegenüber allen anderen Subtypen mindestens 1,5 Dekaden höher.

Allosterisch wirksame Substanzen benutzen am muskarinischen Rezeptor eine vom orthosterischen Haftareal verschiedene Bindungsstelle. Diese Bindungsstelle variiert innerhalb der Rezeptorsubtypen stärker in ihrer Aminosäuresequenz und die Möglichkeit einen subtypselektiven Liganden zu entwickeln ist somit größer.

Die Alkan-Bisammonium-Verbindungen stellen unter den muskarinischen allosterischen Modulatoren eine potente Verbindungsklasse dar. Die Affinitäten der in

dieser Arbeit untersuchten, strukturvariierten Alkan-Bisammonium-Verbindungen zum Orthoster-besetzten Rezeptor sind in Abb. 54 vergleichend dargestellt.

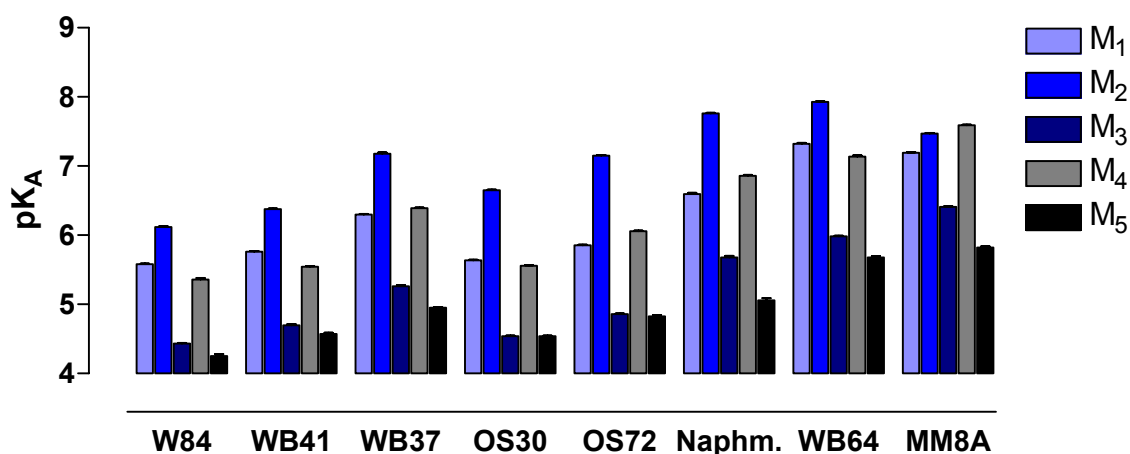


**Abb. 54** Subtypeselektivität der allosterischen Modulatoren an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Muskarinrezeptorsubtypen. Ordinate: pEC<sub>0,5diss</sub>-Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf Rezeptorsubtypen. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanzen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten.

Werden nur die bisquartären Verbindungen betrachtet, ändert sich die Reihenfolge der Subtypeselektivität bezogen auf den [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor durch die strukturellen Veränderungen nur geringfügig. Jede Verbindung zeigt die höchste Affinität zum Subtyp M<sub>2</sub> und die geringste zum Subtyp M<sub>5</sub>. Die zweitgeringste Affinität liegt jeweils zum Subtyp M<sub>3</sub> vor, während die Subtypen M<sub>1</sub> und M<sub>4</sub> immer ungefähr gleichauf an zweiter Stelle liegen. Wird das Phthalimidringsystem durch ein Naphthalimidsystem (WB37) ersetzt, steigt die Affinität an allen Rezeptorsubtypen im Vergleich zu W84 an. Eine Erweiterung des lateralen Ringsystems durch Methylierung (WB41) hat nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Affinitäten. Wird gleichzeitig eine Dimethylierung an der Seitenkette vorgenommen, erhöhen sich die Affinitäten weiter. Die alleinige Dimethylierung der Seitenkette (OS30) führt im Vergleich zur Ausgangsverbindung W84 vor allem zu einem signifikanten Anstieg der Affinität zu M<sub>2</sub>. Die Affinität zu M<sub>4</sub> wird nur in geringem Ausmaß, jedoch auch statistisch signifikant, gesteigert, während sich die Affinitäten zu allen anderen Rezeptorsubtypen kaum verändern. Die an der Seitenkette dimethylierte Methylphthalimid-Verbindung OS72 zeigt einen noch deutlicheren Affinitätsgewinn. Der größte Affinitätsgewinn findet sich jedoch bei Naphmethonium. Der Anstieg fällt

vor allem am Subtyp  $M_2$  überproportional aus. Die Affinität zum Subtyp  $M_5$  ist von den strukturellen Veränderungen am wenigsten betroffen. Somit wird neben einem Anstieg der Affinität zu  $M_2$  auch die Subtypselektivität gesteigert. Die Spanne zwischen höchster und niedrigster Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor hat sich im Vergleich zur Ausgangsverbindung W84 von ca. 2 Dekaden auf ca. 3,5 Dekaden bei Naphmethonium vergrößert. Verantwortlich hierfür ist vor allem die Dimethylierung der Seitenkette. Während die Verbindungen ohne Seitenkettenmethylierung einen relativ gleichmäßigen Anstieg der Affinitäten an allen Subtypen zeigen, konnte erst durch das Einbringen von zwei Methylsubstituenten in der Seitenkette die Spanne der Affinitäten erweitert werden.

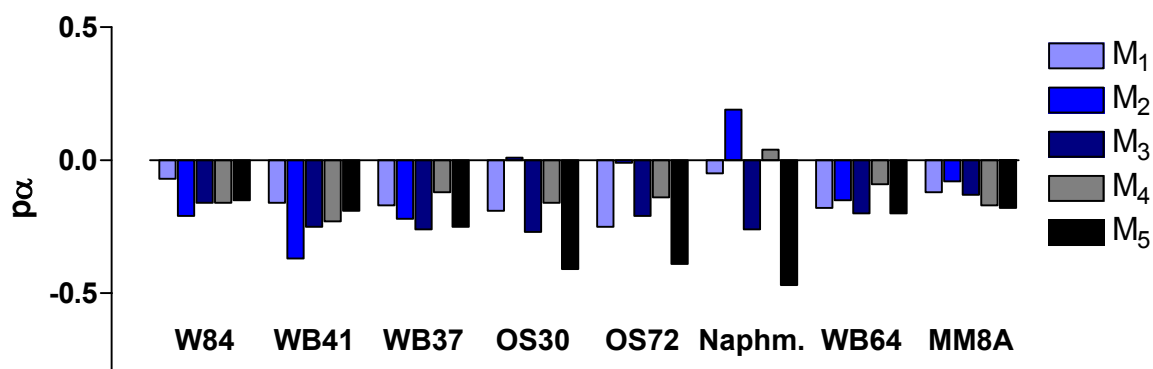
Die beidseitig Naphthalimid-substituierte Verbindung WB64 zeigt, wie die anderen Verbindungen, die höchste Affinität zu  $M_2$  und die niedrigste Affinität zu  $M_5$ . Das Affinitätsniveau ist durch das zweite Naphthalimidringsystem im Vergleich zur entsprechenden Substanz mit einseitigem lateralen Naphthalimid (WB37) an allen Subtypen angehoben. Ein Gewinn an Subtypselektivität ist, auch aufgrund einer fehlenden Seitenkettenmethylierung, gegenüber WB37 somit nicht zu beobachten. Ein deutlich verändertes Rezeptorprofil zeigt die zum WB64 analoge bistertiäre Substanz MM8A. Die Affinität zu  $M_2$  steht hier nicht mehr im Vordergrund. Die Affinitäten zu  $M_2$  und  $M_4$  unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Auch der Unterschied zwischen  $M_2/M_4$  und  $M_1$  ist im Gegensatz zu den anderen Verbindungen relativ gering. MM8A hat zwar auch die geringste Affinität zum Subtyp  $M_5$ , jedoch liegt diese Affinität, wie schon bei WB64, wesentlich höher als bei allen anderen untersuchten Verbindungen. Die Spanne der  $M_2/M_5$ -Subtypselektivität am [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor ist mit 1,8 log Einheiten nicht größer als bei der Ausgangsverbindung W84. Aus dem Vergleich der tertiären Substanz MM8A mit dem quartären Analogon WB64 lässt sich somit schließen, dass die permanenten positiven Ladungen des Moleküls entscheidend für eine höhere Affinität zu  $M_2$  im Vergleich zu  $M_4$  und somit für die Subtypselektivität der Verbindung sind.



**Abb. 55** Subtypeselektivität der allosterischen Modulatoren an unbesetzten Muskarinrezeptorsubtypen. Ordinate: Berechnete  $pK_A$ -Werte (vgl. Tab. 33, Tab. 37 und Tab. 40) der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt mit einer modifizierten Ehlert-Gleichung unter Einbezug von  $EC_{0,5diss}$ . Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanzen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-11 unabhängigen Experimenten.

Abb. 55 zeigt eine Gegenüberstellung der Affinitäten der untersuchten Verbindungen zu den freien Rezeptoren. Auch hier folgt die Reihenfolge der Subtypeselektivität der bisquartären Verbindungen weitgehend folgendem Schema:  $M_2 > M_1 \cong M_4 > M_3 > M_5$ . Eine Vergrößerung der Subtypeselektivität ist hier allerdings nicht so deutlich sichtbar wie am [ $^3H$ ]NMS-besetzten Rezeptor. Die strukturellen Veränderungen, vor allem Modifizierungen des lateralen Ringsystems (WB37, Naphmethonium, WB64), führen am unbesetzten Rezeptor zu einer Erhöhung der Affinitäten der entsprechenden Verbindungen, welche sich aber relativ gleichmäßig auf alle Subtypen auswirkt. Eine Seitenkettenmethylierung (OS72, Naphmethonium) hat einen zusätzlichen affinitätssteigernden Effekt, der aber nur mit einem relativ geringen Gewinn an Subtypeselektivität einhergeht. Die strukturellen Veränderungen haben am freien im Vergleich zum NMS-besetzten Rezeptor also weniger Gewicht. Während die Spanne der  $M_2/M_5$ -Subtypeselektivität von W84 mit ca. 2 Dekaden im Bereich des subtypeselektiven Antagonisten AF-DX 384 liegt, konnte sie durch die strukturellen Veränderungen beim Naphmethonium immerhin auf ca. 2,7 Dekaden gesteigert werden. Insgesamt wird die  $M_2/M_5$ -Selektivität am freien Rezeptor durch die strukturellen Veränderungen von W84 hin zum Naphmethonium zwar gesteigert, der Gewinn an Subtypeselektivität fällt jedoch geringer aus als am NMS-besetzten Rezeptor.

Ein deutlich unterschiedliches Rezeptorprofil zeigt wiederum die bistertiäre Verbindung MM8A. Sie hat die signifikant höchste Affinität zum Subtyp  $M_4$ , gefolgt von  $M_2$  und  $M_1$ . Die geringsten Affinitäten hat MM8A zwar ebenfalls zu  $M_3$  und  $M_5$ , jedoch liegen die  $pK_A$ -Werte auch hier höher als bei den anderen untersuchten Verbindungen. Die Spanne der Subtypselektivität am freien Rezeptor ist mit 1,8 Dekaden deswegen auch geringer als bei den anderen Substanzen. Der Vergleich mit dem bisquartären Analogon WB64 zeigt, das auch hier die Affinitäten an allen Subtypen angehoben sind, was auf den zusätzlichen lateralen Naphthalimidring zurückzuführen ist. Für die Änderung der Reihenfolge der Subtypselektivität beim bistertiären MM8A, vor allem für den Verlust an Affinität zu  $M_2$ , scheinen die fehlenden permanenten positiven Ladungen verantwortlich zu sein.

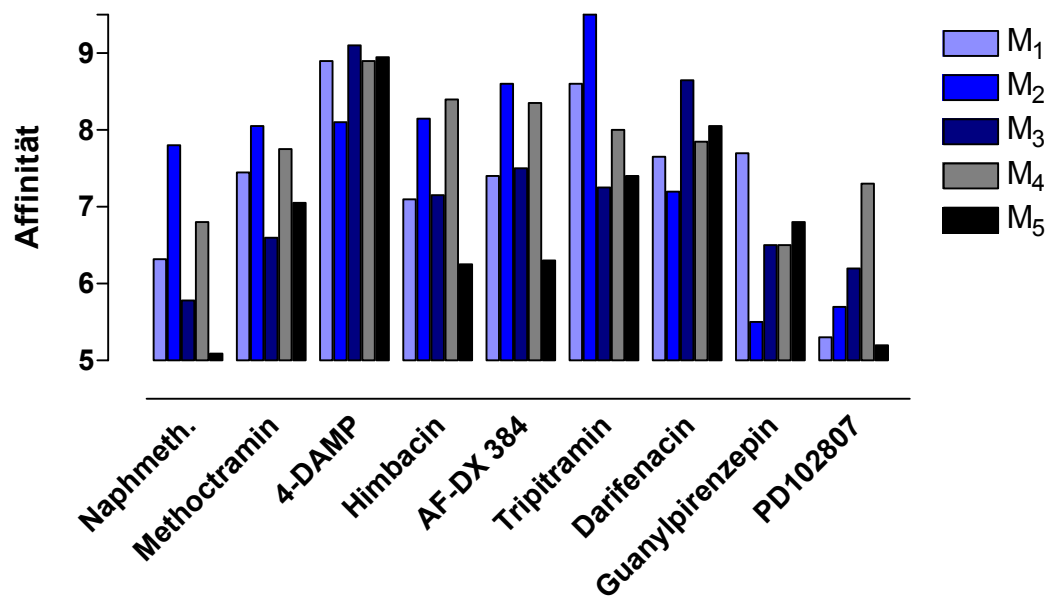


**Abb. 56** Gegenüberstellung der Kooperativitätsfaktoren (minus log-Werte) der allosterischen Modulatoren für die Interaktion mit NMS an den muskarinischen Rezeptorsubtypen. Ordinate:  $p\alpha$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanzen. Dargestellt sind die berechneten Werte aus  $pEC_{0,5diss}/pK_A$ .

Aus den Affinitäten der Verbindungen zum Orthoster-besetzten und zum freien Rezeptor kann der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  bzw. der negative dekadische Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $p\alpha$  abgeleitet werden. Eine Übersicht über diese Kenngröße an den einzelnen Subtypen ist in Abb. 56 dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass die Leitsubstanz W84 an allen Rezeptorsubtypen negative Kooperativität zeigt. Eine Modifizierung des lateralen Ringsystems führt zu keiner Veränderung der Kooperativität. Sowohl die Methylphthalimid-Substanz WB41 als auch die Naphthalimid-Verbindung WB37 erniedrigen an allen Subtypen die  $[^3H]$ NMS-

Gleichgewichtsbindung. Erst die Einführung von zwei Methylsubstituenten in die Seitenkette des Moleküls führt zu einer Beeinflussung der Kooperativität. Bei der seitenkettenmethylierten Phthalimid-Verbindung OS30 sowie bei der entsprechenden Methylphthalimid-Verbindung OS72 wird die Kooperativität an  $M_2$  auf ein neutrales Niveau gehoben, während die Kooperativitäten an den anderen Subtypen unverändert im negativen Bereich bleiben. Erst bei der höchstaffinen Substanz Naphmethonium, bei der die Seitenkettenmethylierung mit einem Naphthalimidringssystem kombiniert ist, kann positive Kooperativität an  $M_2$  beobachtet werden. Gleichzeitig wird die Kooperativität an  $M_1$  und  $M_4$  auf ein nahezu neutrales Maß gehoben. Die Verbindung WB64 und die bistertiäre Verbindung MM8A führen an allen Subtypen zu einer leichten Senkung der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Gleichgewichtsbindung. Die Variabilität innerhalb der Subtypen ist hier relativ gering. Weder ein beidseitiges Naphthalimid noch der Verlust der quartären Stickstoffe vermag also die Kooperativität der Substanzen im Vergleich zu W84 entscheidend zu verändern.

Es lässt sich also resümieren, dass, wie schon bei den Untersuchungen an  $M_2$ -Rezeptoren aus Schweineherz gezeigt wurde, eine Dimethylierung der Seitenkette der entscheidende strukturelle Faktor für eine Beeinflussung der Kooperativität ist. Durch die Seitenkettenmethylierung wird die negative Kooperativität an  $M_2$  auf neutrale Werte abgeschwächt und in Kombination mit stark affinitätssteigernden lateralen Ringsystemen, wie einem Naphthalimidringssystem, sogar in den positiven Bereich gehoben. Bei Naphmethonium wurden zusätzlich, im Gegensatz zu den niedriger affineren Substanzen, auch die Kooperativitäten zu den Subtypen  $M_1$  und  $M_4$  angehoben, wenn auch nicht in dem Maße wie an  $M_2$ . Am Subtyp  $M_5$  führt die Seitenkettenmethylierung hingegen zu verstärkter negativer Kooperativität.



**Abb. 57** Vergleich der Subtypselektivität der Substanz Naphmethonium mit subtypselektiven Liganden an den fünf muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren. Ordinate: Affinitäten der aufgeführten Substanzen, entnommen aus dem IUPHAR Receptor Compendium [70] (bei Angabe eines Affinitätsbereichs für eine Substanz im IUPHAR Receptor Compendium wird jeweils die Mitte der Spanne mit der Säulenhöhe wiedergegeben) bzw. aus Tab. 29 ( $pK_A$ (indirekt) für Naphmethonium). Abszisse: Bezeichnung der Substanzen.

Wie Abb. 57 zeigt, verfügt die allosterische Substanz Naphmethonium, die sich in den Untersuchungen als affinste Substanz herausgestellt hat, im Vergleich mit bekannten subtypselektiven Substanzen über die größte Spanne der Subtypselektivität zwischen dem Rezeptorsubtyp mit der höchsten und dem mit der niedrigsten Affinität. Der therapeutisch relevante Unterschied der Affinitäten zwischen dem affinsten und dem zweitauffinsten Subtyp ist bei Naphmethonium vergleichbar mit dem des M<sub>1</sub>-selektiven Antagonist Guanylpirenzepin oder dem des M<sub>4</sub>-selektiven Antagonisten PD102807. Dieser Unterschied ist jedoch wesentlich größer als zum Beispiel bei dem sich im Handel befindlichen Arzneistoff Darifenacin (Emselex<sup>®</sup>). Somit lässt sich sagen, dass mit Naphmethonium eine allosterische Substanz entwickelt wurde, die sich durch ein besonders scharf konturiertes M<sub>2</sub>-Subtypselektivitätsprofil auszeichnet.



#### ***4.4 Interaktion von Naphmethonium mit Acetylcholin an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen***

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde der Einfluss von allosterischen Modulatoren auf den Partialagonisten Pilocarpin untersucht [72]. Für den auch in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulator Naphmethonium wurde von D. Klemm [73] gezeigt, dass er am  $M_2$ -Rezeptor in der Lage ist, die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor zu steigern, was aber mit einer verringerten intrinsischen Aktivität von Pilocarpin einhergeht. Weitere Versuche mit dem physiologischen Botenstoff Acetylcholin am  $M_2$ -Rezeptor haben gezeigt, dass hier die intrinsische Aktivität des Agonisten unberührt bleibt, jedoch die Affinität von Acetylcholin durch Naphmethonium reduziert wird [50]. Naphmethonium beeinflusst die Bindung des Antagonisten [ $^3$ H]NMS an den muskarinischen Rezeptorsubtypen jeweils unterschiedlich, wie die Ergebnisse der Gleichgewichtsbindungsversuche mit [ $^3$ H]NMS (3.4.4) belegen. Am  $M_2$ -Rezeptor wird die Bindung erhöht, am  $M_1$ - und  $M_4$ -Rezeptor bleibt sie unverändert und am  $M_3$ - und  $M_5$ -Rezeptor wird sie gesenkt. Ob sich mit Acetylcholin ein ähnlich vielseitiges Interaktionsprofil ergibt, sollte anhand von heterologen Interaktionsexperimenten mit [ $^3$ H]NMS und Acetylcholin sondiert werden.

Wie unter 3.5 dargestellt, wurde durch den Einsatz von Naphmethonium die Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin an jedem der fünf Rezeptorsubtypen im Vergleich zur Kontrollkurve nach rechts verschoben. Ein Vergleich der durch Auswertung nach Arunlakshana und Schild (1959) erhaltenen Affinitäten zum freien Rezeptor mit den Werten aus Gleichgewichtsbindungsexperimenten, zeigte, dass die Annahme eines pseudo-kompetitiven Mechanismus belegt werden konnte. Die generierte Gerade der Steigung 1 durch den erzeugten Messpunkt liefert jeweils, durch den Schnittpunkt mit der x-Achse, eine Abschätzung für den Affinitätswert zum freien Rezeptor ( $pK_B$ ), der mit dem  $pK_A$  aus Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit [ $^3$ H]NMS übereinstimmt. Somit kann postuliert werden, dass Naphmethonium an allen fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen stark negativ kooperativ mit Acetylcholin interagiert. Im Gegensatz zur Interaktion mit dem Antagonisten [ $^3$ H]NMS wird also die Bindung von Acetylcholin durch Naphmethonium an allen Rezeptorsubtypen stark gesenkt. Diese Veränderung der Kooperativitäten im Vergleich zum Antagonisten NMS legt nahe, dass sich durch die Bindung des Agonisten im Gegensatz zur

Bindung des Antagonisten die Konformation des Rezeptors derart ändert, dass Naphmethonium seine bindungsfördernde Wirkung nicht mehr beibehalten kann.

## 5 Zusammenfassung

Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie besitzen neben der orthosterischen Bindungsstelle für konventionelle Liganden wie Acetylcholin oder N-Methylscopolamin (NMS) eine zweite, allosterische Bindungsstelle, über die allosterische Substanzen die Bindung des orthosterischen Liganden modulieren. Eine gut untersuchte Verbindungsklasse der allosterischen Modulatoren sind die Alkan-Bisammonium-Verbindungen mit dem Prototyp-Modulator W84 [N,N'-Bis[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-N,N,N',N'-tetramethyl-1,6-hexan-diammoniumdibromid]. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch strukturelle Veränderungen von W84 sowohl die Affinität als auch die Kooperativität der Verbindung mit N-Methylscopolamin (NMS) verändert werden können.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden weitere strukturelle Modifikationen im Hinblick auf eine Affinitäts- und Kooperativitätsveränderung am  $M_2$ -Rezeptor untersucht. Es wurden Radioligandbindungsexperimente mit dem orthosterischen Liganden [ $^3\text{H}$ ]N-Methylscopolamin ([ $^3\text{H}$ ]NMS) als Sonde an  $M_2$ -Rezeptoren aus Hausschweinherzventrikelgewebe durchgeführt (Mg, Tris, Cl,  $\text{P}_i$ -Puffer: 3mM  $\text{MgHPO}_4$ , 50mM Tris-HCl; pH 7,3, 37°C). In kinetischen Experimenten wurde die allosterische Verzögerung der Dissoziation von [ $^3\text{H}$ ]NMS-Rezeptor-Komplexen untersucht. Der hieraus gewonnene Parameter  $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$  ist ein Maß für die Affinität des Allosters zu Orthoster-besetzten Rezeptor. Aus [ $^3\text{H}$ ]NMS-Gleichgewichtsbindungsexperimenten konnte der Parameter  $\text{pK}_A$  als Maß für die Affinität des Allosters zum freien Rezeptor sowie der Faktor  $\alpha$  der Kooperativität zwischen dem Alloster und NMS ermittelt werden.

Die Untersuchungen zu den strukturellen Veränderungen am W84-Grundgerüst ergaben, dass eine Monomethylierung der Propyl-Seitenkette weder für eine Anhebung der Affinität noch für eine Veränderung der Kooperativität mit NMS im Vergleich zur Ausgangsverbindung ausreichend ist. Lediglich bei den an sich höher affinen Methylphthalimid-Verbindungen führte eine Monomethylierung der

Seitenkette zu kleinen Veränderungen der Affinität und einem Anheben der Kooperativität mit NMS auf ein neutrales oder positives Niveau.

Eine Vergrößerung des Seitenkettensubstituenten zeigte, dass eine Substitution mit einem Propyl- bzw. Isobutyl-Rest zu einer signifikanten Steigerung der Affinität führt. Eine Vergrößerung des Methylsubstituenten auf Ethyl brachte hingegen keine Veränderung. Für die Propyl- und Isobutyl-Verbindungen ergaben sich Hinweise auf eine atypische Interaktion mit dem Rezeptor.

Die hochaffine Substanz Naphmethonium, welche einen lateralen Naphthalimidring trägt, fluoresziert. Diese Fluoreszenz kann durch eine Aminierung des Naphthalimids gesteigert werden, was eventuell in zukünftigen Bindungsuntersuchungen ausnutzbar wäre. Die erhobenen Ergebnisse erbrachten, dass sich die Affinitäten zum freien und NMS-besetzten Rezeptor durch die eingeführte Aminogruppe nur marginal verändern. Die positive Kooperativität der Ausgangssubstanz mit [ $^3\text{H}$ ]NMS wird hingegen abgeschwächt. Die ebenfalls untersuchten Synthesestufen der Verbindung, welche eine Nitrogruppe am Naphthalimid tragen, nehmen auch nur geringen Einfluss auf die Affinitäten, schwächen aber ebenfalls die positive Kooperativität von Naphmethonium mit NMS ab. Eine Verkürzung des Naphmethonium-Grundgerüsts auf die Hälfte des Moleküls führt hingegen zu einem Absinken der Affinitäten um bis zu 2,6 Dekaden und zu neutraler Kooperativität mit NMS.

Eine Verminderung der Flexibilität der W84-Struktur durch Einbringen von 3-fach-Bindungen in die Seitenketten der Substanz hat kaum Auswirkungen auf die Affinität der Verbindung. Die Flexibilität der Seitenketten ist somit nicht essentiell.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden verschiedene strukturveränderte Alkan-Bisammonium-Derivate im Hinblick auf ihre Subtypselektivität an allen fünf Muskarinrezeptoren, gewonnen aus stabil transfizierten CHO-Zellen, untersucht. Es wurde hierbei erstmals die Affinität von W84 zu allen Subtypen bestimmt. Durch Strukturveränderungen, wie Methylierung des Phthalimids, Austausch des Phthalimids gegen ein Naphthalimid und Methylierung der Seitenkette war das Grundgerüst bis hin zum Naphmethonium verändert. Die Reihenfolge der Subtypselektivität folgt bei allen Verbindungen weitgehend folgendem Schema:  $M_2 > M_1 \cong M_4 > M_3 > M_5$ . Es konnte gezeigt werden, dass durch die strukturellen Modifikationen von W84 hin zum Naphmethonium vor allem die Spanne der Affinitäten am NMS-besetzten Rezeptor deutlich gesteigert werden konnte. Am freien

Rezeptor wurde die Spanne zwar auch vergrößert, jedoch fiel der Gewinn an Subtypselektivität hier nicht so deutlich aus. Eine untersuchte bistertiäre Verbindung zeigte eine reduzierte Affinität zum Subtyp  $M_2$  und somit kaum einen Affinitätsunterschied zwischen  $M_2$  und  $M_4$ . Die permanent positiven Ladungen des Moleküls sind somit vor allem für die Affinität zum Subtyp  $M_2$  wichtig.

Abschließend wurde mit Hilfe von [ $^3H$ ]NMS-Interaktionsexperimenten die Kooperativität der hochaffinen Substanz Naphmethonium mit dem natürlichen Agonisten Acetylcholin abgeschätzt. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bereits bekannt, dass Naphmethonium mit Acetylcholin am  $M_2$ -Rezeptor stark negativ kooperativ ist. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl für  $M_2$  als auch für die restlichen muskarinischen Subtypen die Annahme einer stark negativen Kooperativität zwischen Naphmethonium und Acetylcholin bekräftigt werden



## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Hulme EC, Birdsall NJM, and Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **30**: 633-673
- [2] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, LeTrong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin. *Science*, **289**: 739-745
- [3] Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, and Kangawa K (1986) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, **323**: 411-416.
- [4] Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, and Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*, **237**: 527-532.
- [5] Bonner TI, Young AC, Brann MR, and Buckley NJ (1988) Cloning and expression of the human and rat M<sub>5</sub> muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*, **1**: 403-410.
- [6] Caulfield MP and Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*, **50**: 279-290.
- [7] Wess J (1998) Molecular basis of receptor g-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther*, **80**: 231-264
- [8] Krejčí A and Tuček S (2002) Quantitation of mRNAs for M<sub>1</sub> to M<sub>5</sub> subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol*, **61**: 1267-1272.
- [9] Li M, Yasuda RP, Wall SJ, Wellstein A, and Wolfe BB (1991) Distribution of m2 muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for m2 receptors. *Mol Pharmacol*, **40**: 28-35.
- [10] Dörje F, Levey AI, and Brann MR (1991) Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. *Mol Pharmacol* **40**: 459-462.
- [11] Levey AI (1993) Immunological localization of M<sub>1</sub> - M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci*, **52**: 441-448.
- [12] Mutschler E, Moser U, Wess J, and Lambrecht G (1995) Muscarinic receptor subtypes- pharmacological, molecular biological and therapeutical aspects. *Pharm Acta Helv* **69**: 243-258.
- [13] Birdsall N, Nathanson N, and Schwarz R (2001) Muscarinic receptors: it's a knockout. *Trends Pharmacol Sci*, **22**: 215-219
- [14] Duttaroy A, Gomeza J, Gan J, Siddiqui N, Basile A, Harman W, Smith P, Felder C, Levey A, and Wess J (2002) Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, **62**: 1084-1093
- [15] Gomeza J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, and Wess J (1999) Pronounced pharmacologic deficits in M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 1692-1697.

- [16] Rouse ST, Hamilton SE, Potter LT, Nathanson NM, and Conn PJ (2000) Muscarinic-induced modulation of potassium conductances is unchanged in mouse hippocampal pyramidal cells that lack functional M<sub>1</sub> receptors. *Neurosci Lett*, **278**: 61-64.
- [17] Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, and Taketo MM (2000) Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M<sub>3</sub> subtype. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 9579-9584.
- [18] Christopoulos A and Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allostery and complexing. *Pharmacol Rev* **54**: 323-374.
- [19] Ellis J, Huyler J, and Brann MR (1991) Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* **42**: 1927-1932.
- [20] Wess J (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 308-313.
- [21] Ellis J, Seidenberg M, and Brann MR (1993) Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol* **44**: 583-588.
- [22] Leppik RA, Miller RC, Eck M, and Paquet JL (1994) Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **45**: 983-990.
- [23] Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Hölte HD, and Mohr K (2003) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M<sub>2</sub> receptor that account entirely for the M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub> subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* **64**: 21-31.
- [24] Tränkle C and Mohr K (1997) Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M<sub>2</sub> receptors. *Mol Pharmacol* **51**: 674-682.
- [25] Lanzafranco A, Christopoulos A, and Mitchelson F (1997) Three allosteric modulators act at a common site, distinct from that of competitive antagonists, at muscarinic acetylcholine M<sub>2</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **282**: 278-285.
- [26] Lazareno S, Popham A, and Birdsall NJ (2000) Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-[methyl-3H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol* **58**: 194-207.
- [27] Tränkle C, Dittmann A, Schulz U, Weyand O, Buller S, Jöhren K, Heller E, Birdsall NJ, Holzgrabe U, Ellis J, Holtje HD, and Mohr K (2005) Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M2 and M2/M5 chimeric receptors. *Mol Pharmacol* **68**: 1597-1610
- [28] Jepsen K, Lüllmann H, Mohr K, and Pfeffer J (1988) Allosteric stabilization of 3H-N-methylscopolamine binding in guinea-pig myocardium by an antidote against organophosphate intoxication. *Pharmacol Toxicol* **63**: 163-168.
- [29] Schröter A, Tränkle C, and Mohr K (2000) Modes of allosteric interactions with free and [<sup>3</sup>H]N-methylscopolamine-occupied muscarinic M<sub>2</sub> receptors as deduced from buffer-dependent potency shifts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**: 512-519.



- [30] Lee N and El-Fakahany E (1988) Influence of ligand choice on the apparent binding profile of gallamine to cardiac muscarinic receptors. Identification of three main types of gallamine-muscarinic receptor interaction. *J Pharmacol Exp Ther* **246**: 829-838.
- [31] Lüllmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC, and Wassermann O (1969) Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* **6**: 241-247.
- [32] Holzgrabe U and Mohr K (1998) Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today* **3**: 214-222.
- [33] Ellis J and Seidenberg M (2000) Interactions of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: studies with chimeric receptors. *Mol Pharmacol* **58**: 1451-1460.
- [34] Buller S, Zlotos DP, Mohr K, and Ellis J (2002) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol* **61**: 160-168.
- [35] Birdsall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Kuonen D, Lazareno S, Popham A, and Sugimoto M (1997) Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci* **60**: 1047-1052.
- [36] Kostenis E, Holzgrabe U, and Mohr K (1994) Allosteric effect on muscarinic M<sub>2</sub>-receptors of derivatives of the alkane-bis-ammonium compound W84. Comparison with bispyridinium-type allosteric modulators. *Eur J Med Chem* **29**: 947-953.
- [37] Gilsbach R, Großmüller M, Alptüzün V, Erciyas E, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2003) Cooperative interactions at M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptors: structure/activity relationships in stepwise shortened bispyridinium- and bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *Neurochem Res* **28**(3/4): 667-673.
- [38] Staudt M, Tränkle C, Mohr K, and Holzgrabe U (1998) Contribution of lateral substituents in heptane-bisammonium derivatives to the allosteric stabilization of antagonist binding to M<sub>2</sub>-receptors. *Life Sci* **62**: 423-429.
- [39] Staudt M, Tränkle C, Mohr K, and Holzgrabe U (2003) Contribution of lateral substituents in symmetrical and non-symmetrical heptane-bisammonio compounds to the allosteric stabilization of N-methylscopolamine binding to muscarinic M<sub>2</sub> receptors. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **336**: 385-389.
- [40] Nassif-Makki T, Tränkle C, Zlotos DP, Bejeuhr G, Cambareri A, Pfletschinger C, Kostenis E, Mohr K, and Holzgrabe U (1999) Bisquaternary ligands of the common allosteric site of M<sub>2</sub> acetylcholine receptors: Search for the minimum essential distances between the pharmacophoric elements. *J Med Chem* **42**: 849-858.
- [41] Botero Cid HM, Tränkle C, Pick R, Mies-Klomfaß E, Kostenis E, Mohr K, and Holzgrabe U (2000) Structure-activity relationships in a series of bisquaternary phthalimidine derivatives modulating the muscarinic M<sub>2</sub>-receptor allosterically. *J Med Chem* **43**: 2155-2164.
- [42] Daiß JO, Duda-Johner S, Burschka C, Holzgrabe U, Mohr K, and Tacke R (2002) N<sup>+</sup>/Si replacement as a tool for probing the pharmacophore of allosteric modulators of muscarinic M<sub>2</sub>

- receptors: synthesis, allosteric potency, and positive cooperativity of silicon-based W84 derivatives. *Organometallics* **21**: 803-811.
- [43]Johner S, Pick R, Buller S, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (1999) Topology of allosteric binding in free and antagonist liganded muscarinic acetylcholine receptors. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **332** (suppl.), R69.
- [44]Tränkle C, Mies-Klomfass E, Cid MH, Holzgrabe U, and Mohr K (1998) Identification of a [<sup>3</sup>H]Ligand for the common allosteric site of muscarinic acetylcholine M<sub>2</sub> receptors. *Mol Pharmacol* **54**: 139-145.
- [45]Li R, Tränkle C, Mohr K, and Holzgrabe U (2001) Hexamethonium-type allosteric modulators of the muscarinic receptors bearing lateral dibenzapine moieties. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **334**: 121-124.
- [46]Bender W, Staudt M, Mohr K, and Holzgrabe U (2000) Probing the size of a hydrophobic binding pocket within the allosteric site of the muscarinic acetylcholine M<sub>2</sub>-receptors. *Life Sci* **66**: 1672-1682.
- [47]Muth M, Bender W, Scharfenstein O, Holzgrabe U, Balatkova E, Tränkle C, and Mohr K (2003) Systematic development of high affinity bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. *J Med Chem* **46**: 1031-1040.
- [48]Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2002) Elevation of ligand binding to muscarinic M<sub>2</sub> acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *J Med Chem* **45**:3809-3812.
- [49]Muth M. (2004): Synthese und Charakterisierung allosterer Modulatoren muscarinischer M<sub>2</sub>-Rezeptoren – Strukturvariationen der Bis(ammonium)alkan-Verbindung W84. *Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- [50]Schmalenbach C (2006). Allosterische Modulation der durch Acetylcholin und weitere Agonisten ausgelösten Aktivierung von muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. *Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*.
- [51]Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- [52]Barlow R and Blake J (1989) Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci*, **10**: 440-441
- [53]Hill A (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Proc)*, **40**: iv-vii
- [54]Cheng YC and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099-3108
- [55]DeBlasi A, O'Reilly K, and Motulsky HJ (1989) Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 227-229

- [56] Scatchard G (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* **51**: 660-666
- [57] Bennett J and Yamamura H (1985) Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. Neurotransmitter receptor binding (2<sup>nd</sup> ed.), edited by Yamamura H et al., Raven Press, New York, 61-89
- [58] Ehlert FJ (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* **33**: 187-194
- [59] Lazareno S and Birdsall N (1995) Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labelled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, **48**: 362-378
- [60] Arunlakshana O and Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol*, **14**: 48-58
- [61] Kostenis E and Mohr K (1996) Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci*, **17**: 280-283
- [62] Daiß JO, Albrecht M, Mohr K, and Tacke R (2004) A novel silicon-based uncharged allosteric modulator for ligand binding to muscarinic M<sub>2</sub> receptors: synthesis and pharmacological characterization. *Organometallics* **23**: 6052-6057
- [63] Schulz U (1998). Antagonismus-Untersuchungen zur Topographie der Bindung allosterischer Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M<sub>2</sub>. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [64] Dörje F, Wess J, Lambrecht G, Tacke R, Mutschler E, and Brann MR (1991) Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, **256**: 727-733
- [65] Tränkle C, Andresen I, Lambrecht G, and Mohr K (1998) M<sub>2</sub> receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: possible involvement of the common allosteric site. *Mol Pharmacol*, **53**: 304-312
- [66] Lazareno S, Farries T, and Birdsall NJ (1993) Pharmacological characterization of guanine nucleotide exchange reactions in membranes from CHO cells stably transfected with human muscarinic receptors m1-m4. *Life Sci* **52**: 449-456
- [67] Gnagey A and Ellis J (1996) Allosteric regulation of the binding of [<sup>3</sup>H]acetylcholine to m2 muscarinic receptors. *Biochem Pharmacol* **52**: 1767-1775
- [68] Großmüller C (2003). Interaktion allosterischer Modulatoren mit dem Agonisten [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M und dem Antagonisten [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [69] Albrecht M (2005). Singulärer N<sup>+</sup>/Si-Austausch im Molekülgerüst allosterischer Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ: Konsequenzen für die Interaktion mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren vom Subtyp M<sub>2</sub>. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [70] The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification (1998), ISBN: 0953351009

- [71] Böhme T, Keim C, Kreutzmann K, Linder M, Dinger mann T, Dannhardt G, Mutschler E, and Lambrecht G (2002) Structure-activity relationships of dimethindene derivatives as new M<sub>2</sub>-selective muscarinic receptor antagonists. *J Med Chem*, **46**: 856-867
- [72] Zahn K, Eckstein N, Tränkle C, Sadee W, and Mohr K (2002) Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **301**: 720-728.
- [73] Klemt D (2005). Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am muskarinischen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Acetylcholin-Rezeptor. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

## 7 Anhang

Im Folgenden wird eine Zusammenfassung der Bindungsparameter aller untersuchten Substanzen an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> gegeben.

Substanz	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
W84	5,51 ± 0,02 n = 5	5,91 ± 0,09 n = 5	4,27 ± 0,04 n = 5	5,20 ± 0,03 n = 4	4,10 ± 0,05 n = 5
WB41	5,60 ± 0,05 n = 4	6,01 ± 0,06 n = 6	4,45 ± 0,10 n = 4	5,32 ± 0,03 n = 4	4,38 ± 0,18 n = 3
WB37	6,13 ± 0,03 n = 4	6,96 ± 0,07 n = 6	5,00 ± 0,09 n = 4	6,27 ± 0,06 n = 4	4,70 ± 0,07 n = 4
OS30	5,45 ± 0,03 n = 4	6,66 ± 0,05 n = 6	4,27 ± 0,04 n = 6	5,40 ± 0,03 n = 4	4,13 ± 0,08 n = 4
OS72	5,61 ± 0,05 n = 6	7,14 ± 0,07 n = 6	4,65 ± 0,03 n = 6	5,92 ± 0,02 n = 6	4,44 ± 0,04 n = 6
Naphmeth.	6,54 ± 0,03 n = 4	7,95 ± 0,04 n = 4	5,42 ± 0,03 n = 4	6,90 ± 0,07 n = 4	4,59 ± 0,06 n = 4
MM8A	7,07 ± 0,05 n = 4	7,39 ± 0,05 n = 6	6,28 ± 0,04 n = 6	7,42 ± 0,06 n = 4	5,64 ± 0,09 n = 4
WB64	7,11 ± 0,07 n = 4	7,78 ± 0,06 n = 6	5,76 ± 0,05 n = 4	6,96 ± 0,06 n = 4	5,45 ± 0,11 n = 6

**Tab. 42** pEC<sub>0,5diss</sub>-Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler.

Substanz		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
W84	indirekt	-0,07	-0,21	-0,16	-0,16	-0,15
	direkt	n.b.	-0,45 ± 0,04 n = 11	-0,18 ± 0,03 n = 3	n.b.	n.b.
WB41	indirekt	-0,16	-0,37	-0,25	-0,23	-0,19
	direkt	-0,21 ± 0,04 n = 3	-0,44 ± 0,03 n = 4	-0,26 ± 0,08 n = 3	-0,23 ± 0,03 n = 3	-0,20 ± 0,05 n = 3
WB37	indirekt	-0,17	-0,22	-0,26	-0,12	-0,25
	direkt	-0,18 ± 0,03 n = 5	-0,29 ± 0,02 n = 3	-0,28 ± 0,03 n = 3	-0,15 ± 0,03 n = 5	-0,29 ± 0,02 n = 4
OS30	indirekt	-0,19	0,01	-0,27	-0,16	-0,41
	direkt	-0,20 ± 0,03 n = 4	n.b.	-0,35 ± 0,03 n = 4	-0,24 ± 0,02 n = 9	-0,56 ± 0,03 n = 4
OS72	indirekt	-0,25	-0,01	-0,21	-0,14	-0,39
	direkt	-0,29 ± 0,02 n = 4	n.b.	-0,29 ± 0,08 n = 4	-0,23 ± 0,09 n = 3	-0,39 ± 0,08 n = 4
Naphm.	indirekt	-0,05	0,19	-0,26	0,04	-0,47
	direkt	n.b.	0,23 ± 0,01 n = 4	-0,31 ± 0,02 n = 3	n.b.	-0,53 ± 0,05 n = 4
MM8A	indirekt	-0,12	-0,08	-0,13	-0,17	-0,18
	direkt	-0,14 ± 0,03 n = 5	-0,09 ± 0,01 n = 6	-0,13 ± 0,01 n = 3	-0,16 ± 0,03 n = 5	-0,13 ± 0,02 n = 3
WB64	indirekt	-0,18	-0,15	-0,20	-0,09	-0,20
	direkt	-0,19 ± 0,01 n = 3	-0,20 ± 0,03 n = 4	-0,18 ± 0,03 n = 5	-0,15 ± 0,06 n = 3	-0,14 ± 0,03 n = 5

**Tab. 43** p $\alpha$ -Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt mit der nicht modifizierten Gleichung nach Ehlert (direkt)(dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler) bzw. berechnet, nach Analyse der Daten mit der modifizierten Ehlert-Gleichung zur Ermittlung von K<sub>A</sub> (indirekt). Dargestellt sind hier die berechneten Werte aus pEC<sub>0,5diss</sub>-pK<sub>A</sub>. n.b.: pK<sub>A</sub> konnte aus den experimentellen Daten nicht direkt bestimmt werden, da eine Auswertung mit der Gleichung nach Ehlert zu keiner sinnvollen Kurvenanpassung führte. Deswegen musste zur Auswertung die modifizierte Gleichung nach Ehlert verwendet werden.

Substanz		M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
WB84	indirekt	5,58 ± 0,01 n = 7	6,12 ± 0,01 n = 11	4,43 ± 0,01 n = 3	5,36 ± 0,02 n = 3	4,25 ± 0,03 n = 4
	direkt	n.b.	5,48 ± 0,07 n = 11	4,36 ± 0,10 n = 3	n.b.	n.b.
WB41	indirekt	5,76 ± 0,01 n = 3	6,38 ± 0,01 n = 4	4,70 ± 0,02 n = 3	5,55 ± 0,01 n = 3	4,57 ± 0,02 n = 3
	direkt	5,41 ± 0,16 n = 3	6,10 ± 0,04 n = 4	4,79 ± 0,11 n = 3	5,50 ± 0,07 n = 3	4,03 ± 0,12 n = 3
WB37	indirekt	6,30 ± 0,01 n = 5	7,18 ± 0,02 n = 3	5,26 ± 0,02 n = 3	6,39 ± 0,01 n = 5	4,95 ± 0,01 n = 4
	direkt	6,25 ± 0,08 n = 5	6,66 ± 0,11 n = 3	5,16 ± 0,09 n = 3	6,39 ± 0,30 n = 5	4,80 ± 0,09 n = 4
OS30	indirekt	5,64 ± 0,01 n = 4	6,65 ± 0,01 n = 5	4,54 ± 0,01 n = 4	5,56 ± 0,01 n = 9	4,54 ± 0,01 n = 4
	direkt	5,58 ± 0,08 n = 4	n.b.	4,29 ± 0,10 n = 4	5,25 ± 0,23 n = 3	4,26 ± 0,04 n = 4
OS72	indirekt	5,86 ± 0,01 n = 4	7,15 ± 0,01 n = 4	4,86 ± 0,01 n = 4	6,06 ± 0,01 n = 3	4,83 ± 0,02 n = 4
	direkt	5,70 ± 0,11 n = 4	n.b.	4,77 ± 0,22 n = 4	5,85 ± 0,23 n = 3	4,88 ± 0,08 n = 4
Naphm.	indirekt	6,59 ± 0,02 n = 4	7,76 ± 0,01 n = 4	5,68 ± 0,02 n = 3	6,86 ± 0,01 n = 5	5,06 ± 0,03 n = 4
	direkt	n.b.	7,29 ± 0,06 n = 4	5,58 ± 0,14 n = 3	n.b.	4,62 ± 0,10 n = 4
MM8A	indirekt	7,19 ± 0,01 n = 5	7,47 ± 0,01 n = 6	6,41 ± 0,01 n = 3	7,59 ± 0,01 n = 5	5,82 ± 0,02 n = 3
	direkt	7,17 ± 0,20 n = 5	7,53 ± 0,26 n = 6	6,41 ± 0,10 n = 3	7,95 ± 0,29 n = 5	6,19 ± 0,12 n = 3
WB64	indirekt	7,32 ± 0,01 n = 3	7,93 ± 0,01 n = 4	5,98 ± 0,01 n = 5	7,14 ± 0,02 n = 3	5,68 ± 0,02 n = 5
	direkt	7,25 ± 0,10 n = 3	7,52 ± 0,16 n = 4	6,23 ± 0,22 n = 5	6,98 ± 0,38 n = 3	6,28 ± 0,33 n = 5

**Tab. 44** pK<sub>A</sub>-Werte der angezeigten allosterischen Modulatoren an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen, ermittelt anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung durch Ersatz von  $\alpha$  durch EC<sub>0,5diss</sub>/K<sub>A</sub> (indirekt) bzw. mit der nicht modifizierten Gleichung nach Ehlert (direkt). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler. n.b.: pK<sub>A</sub> konnte aus den experimentellen Daten nicht direkt bestimmt werden, da eine Auswertung mit der Gleichung nach Ehlert zu keiner sinnvollen Kurvenanpassung führte. Deswegen musste zur Auswertung die modifizierte Gleichung nach Ehlert verwendet werden.





## 8 Veröffentlichungen

### 8.1 Wissenschaftliche Originalarbeiten

Muth, M., Sennwitz, M., Mohr, K. & Holzgrave, U. (2005): Muscarinic allosteric enhancers of ligand binding: pivotal pharmacophoric elements in hexamethonio-type agents. *J. Med. Chem.* **48**: 2212-2217.

### 8.2 Abstrakta und Kongressbeiträge

Sennwitz M., Duda-Johner S., Muth M., Holzgrave U., and Mohr K (2003): Subtype selectivity of Naphmethonium, a highly potent muscarinic allosteric agent. *DPhG-Jahrestagung Würzburg*.

Sennwitz M., Muth M., Scharfenstein O., Holzgrave U., and Mohr K (2004): Subtype-selectivity of bis(ammonio)alkane-type muscarinic allosteric modulators. *Programm und Abstraktbuch der DPhG-Jahrestagung in Regensburg (ISBN 3-00-014723-3)*: P P24.

Holzgrave U., Muth M., Sennwitz M, Tränkle C., Mohr K. (2004): Systematic development of enhancers of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors: bis(ammonio)alkane-type compounds. *International Conference on Medicinal Chemistry, Copenhagen*.

Sennwitz M., Muth M., Scharfenstein O., Bender W., Heller E., Holzgrave U. and Mohr, K. (2005): Consequences of structural variations of bis(ammonio)alkane-type ligands for muscarinic receptor subtype selectivity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **371 (Suppl 1)**: R20.



# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. K. Mohr für die Möglichkeit eine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Die hervorragende Betreuung und seine wissenschaftlichen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Kurt Racké danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn PD Dr. Matthias Kassack und Herrn Prof. Dr. Volker Herzog möchte ich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission herzlich danken.

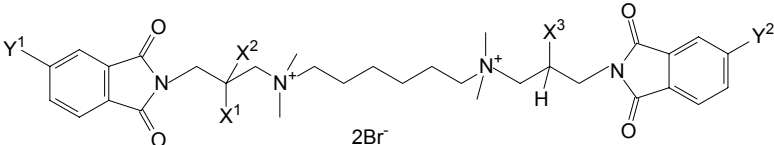
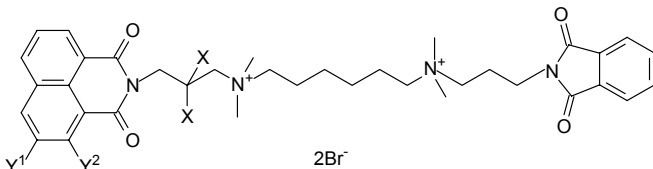
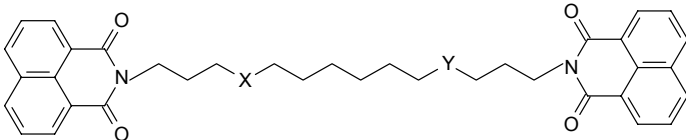
Herrn PD Dr. Christian Tränkle möchte ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie seine fachlichen Beiträge über die letzten Jahre danken.

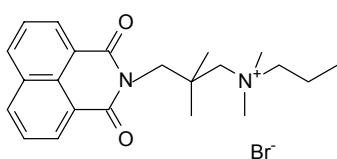
Allen Arbeitskollegen der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die gute Zusammenarbeit. Die freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre wird mir stets in guter Erinnerung bleiben.



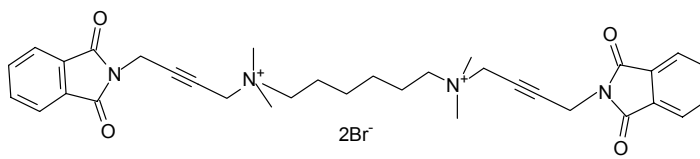




<div></div>					
	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>3</sup>	Y <sup>1</sup>	Y <sup>2</sup>
W84	H	H	H	H	H
MM5A	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
OS30	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
MM4A	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
MM4F	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
MM4G	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H
MM4H	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
WB41	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H
MM5B	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
OS72	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
MM4E	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<div></div>					
	Y <sup>1</sup>		Y <sup>2</sup>		X
WB37	H		H		H
Naphmethonium	H		H		CH <sub>3</sub>
MM3J	NH <sub>2</sub>		H		CH <sub>3</sub>
MM3L	NO <sub>2</sub>		H		CH <sub>3</sub>
MM3M	H		NO <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>
<div></div>					
	X		Y		
TDH <sub>2</sub>	N <sup>+</sup> H <sub>2</sub>		Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		
TDF	N <sup>+</sup> HCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F		Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		
WB64	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		
MM8A	N <sup>+</sup> HCH <sub>3</sub>		N <sup>+</sup> HCH <sub>3</sub>		



**MM7A**



**RP25**